

Institut für Klinische Virologie der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

**Vergleichende Untersuchungen zur
Struktur der Genome Tumor-erzeugender Herpesviren**

Habilitationsschrift
dem Fachbereich Medizin der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Dr. med. Georg-Wilhelm Bornkamm
Erlangen 1976

1977 № 93

Institut für Klinische Virologie der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

**Vergleichende Untersuchungen zur
Struktur der Genome Tumor-erzeugender Herpesviren**

Habilitationsschrift
dem Fachbereich Medizin der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Dr. med. Georg-Wilhelm Bornkamm
Erlangen 1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	13
1. Virus und Zellkulturen	13
2. Reinigung von H.saimiri und H.ateles	14
3. Reinigung von Epstein-Barr Virus	15
4. Präparation von viraler DNA	15
5. Präparation zellulärer DNA	16
6. Radioaktive Markierung von DNA in vitro	16
7. In vitro Transcription von viraler DNA	17
8. DNA-RNA-Filterhybridisierung	18
9. Reassoziationskinetik	19
10. Schmelzpunktsbestimmung von DNA-Hybrid-Molekülen	20
11. Präparation viraler DNA für die Elektronenmikroskopie	21
12. Partielle Denaturierung von DNA	21
13. Elektronenmikroskopie von DNA	23
14. Längenmessung und Computeranalyse	23
15. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	24
16. Äthanolpräzipitation von DNA	24
17. Gelelektrophorese von DNA	25
18. Reinigung von BK-Virus und BK-Virus DNA	26
19. Isolierung von zirkulärer EBV DNA aus Raji-Zellen	28

C. Ergebnisse

I. Struktur der DNA onkogener Affen-Herpesviren	30
1. H.saimiri DNA	30
a. Größe der L-Region und der H-Wiederholungseinheit	30
b. Anordnung der Fragmente in der repetitiven DNA	33
c. Partielle Denaturierung: Anordnung der schweren und leichten Sequenzen in M-DNA	35
d. Partielle Denaturierung: Orientierung der L-Region in M-DNA	38
2. Struktur von H.ateles DNA	40
a. Spaltung von H.ateles M-DNA mit Sma I	41
b. Partielle Denaturierung von H.ateles M-DNA	42
c. Partielle Denaturierung von H.ateles H-Genomen	42
3. Verwandtschaft von H.saimiri und H.ateles. Homologien zwischen DNA Sequenzen beider Viren	44
II. Struktur der Epstein-Barr Virus DNA	48
1. Epstein-Barr Virus DNA aus Viruspartikeln	48
a. Virusreinigung	49
b. Reinigung von Epstein-Barr Virus DNA	51
c. Spezifität der Virus DNA	52
d. Partielle Denaturierung von B 95-8 Virus DNA	54
e. Partielle Denaturierung von P3HR1 Virus DNA	57
f. Vergleich der Denaturierungsmuster von P3HR1 und B 95-8 Virus DNA	59
g. Spaltung von B 95-8 und P3HR1 Virus DNA mit den Restriktionsendonukleasen EcoR I, Xba I und Kpn I	61

2. Epstein-Barr Virus DNA in transformierten Zellen	67
a. EBV DNA in einer nicht-Virus-produzierenden Burkitt-Lymphom-Zelllinie	68
b. Zirkuläre EBV DNA in Tumorzellen des Nasopharynx-Carcinoms	72
D. Diskussion	74
E. Zusammenfassung	87
F. Literaturhinweise	88

ABKÜRZUNGEN

Ipm	Impulse pro Minute
Dpm	Desintegrationen pro Minute
Upm	Umdrehungen pro Minute
EDTA	Äthylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
TTP	Thymidintriphosphat

A. EINLEITUNG

Schon seit Anfang dieses Jahrhunderts ist bekannt, daß Viren Tumoren erzeugen können. 1907 beschrieb Ciuffo die zellfreie Übertragung menschlicher Warzen (Ciuffo, 1907). 1908/1909 wurde von Ellermann und Bang die Geflügelleukämie zellfrei übertragen (Ellermann und Bang, 1908/1909), und zwei Jahre später gelang Rous die Übertragung von Hühnersarkomen mit Hilfe filtrierter Extrakte (Rous, 1911). Diese Befunde blieben jedoch über mehrere Jahrzehnte hin fast unbeachtet. Das allgemeine Interesse an Viren als Erreger von Tumoren erwachte erst 1951, als Ludwik Gross die zellfreie Übertragung von Mäuseleukämien gelang (Gross, 1951). Seither sind so viele Tumoren in verschiedenen Tierspecies als virusinduziert erkannt, daß die Frage immer brennender wurde, ob Viren auch beim Menschen Tumoren erzeugen. Trotz intensiver Arbeit an dieser Frage in vielen Laboratorien ist nur wenig bekannt.

Als gesichert gelten kann die Virusätiologie der menschlichen Warzen, nicht zuletzt, weil hier aufgrund der Einschätzung der Warzen als harmlos Übertragungsversuche am Menschen durchgeführt wurden (Ciuffo, 1907). Das einzige Virus, das heute neben den menschlichen Papillomviren als Tumorstoff gelten kann, ist das Epstein-Barr Virus (EBV). Seit seiner Entdeckung (Epstein et al., 1964) in Ultradünnschnitten von lymphoblastoiden Zelllinien, die von einem Burkitt-Lymphom angezüchtet waren, hat sich die Evidenz, daß es sich beim Epstein-Barr Virus tatsächlich um ein menschliches Tumorstoff handelt, ständig vermehrt. Die

Ergebnisse lassen sich wie folgend zusammenfassen (zur Übersicht: Klein, 1974; Pagano, 1974a; zur Hausen, 1975):

1. Das Virus ist weltweit verbreitet. 80-90% aller Erwachsenen haben Antikörper gegen das Virus (Henle and Henle, 1966 a,b; Svedmyr and Demissie, 1968; Demissie and Svedmyr, 1969; Goldman et al., 1968; Pereira et al., 1969).
2. Das Epstein-Barr Virus ist der Erreger der infektiösen Mononukleose (G. Henle et al., 1968; Evans et al., 1968; Niederman et al., 1968,1970; Hirshaut et al., 1969; Sawyer et al., 1971; Henle and Henle, 1973).
3. Patienten mit Burkitt Lymphom (BL) und Nasopharynx-Carcinom (NPC) haben extrem hohe Antikörpertiter gegen EBV (Old et al., 1966; G. Henle et al., 1969, 1971; G. Klein et al., 1969; de Shryver et al., 1969; W. Henle et al., 1970; Henle and Henle, 1970, 1974). Beide Tumoren zeigen eine charakteristische geographische Häufung: das Burkitt Lymphom, ein Tumor des Kindesalters, in den tropischen Gegenden Äuatorialafrikas (Burkitt, 1961; Burkitt and Davies, 1961), das Nasopharynx-Carcinom, ein Tumor, der vorwiegend bei Erwachsenen um 50 Jahre auftritt, in Südchina (Ho, 1972; Muir, 1972).
4. Die Primärinfektion geht der Tumorentstehung um Jahre bis Jahrzehnte voraus (Henle and Henle, 1974; de Thé et al. in Vorbereitung).

5. In Biopsien vom Burkitt Lymphom und Nasopharynx-Carcinom lassen sich regelmäßig virale Nukleinsäuren nachweisen (zur Hausen, et al., 1970; Nonoyama et al., 1973; Nonoyama and Pagano, 1973; Wolf et al., 1973; Lindahl et al., 1974), ohne daß Viruspartikel zu finden sind (Epstein and Herdson, 1963; Achong and Epstein, 1966; Rabson et al., 1966).
6. Mindestens ein virusspezifisches Antigen (EBNA = EBV spezifisches nukleäres Antigen) wird im Zellkern der Tumorzellen exprimiert (Reedman and Klein, 1973; Reedman et al., 1974).
7. Ein Teil der Tumorzellen trägt auf der Zelloberfläche ein virusspezifisches Membrantigen (MA) (Klein et al., 1966, 1967).
8. Epstein-Barr Virus transformiert menschliche B-Lymphozyten, wobei sich die Zellen zu Lymphoblasten entwickeln und zu permanenten Zelllinien auswachsen (W.Henle et al., 1967; Pope et al., 1969; Gerber et al., 1969; Miller et al., 1971; Schneider and zur Hausen, 1975).
9. Epstein-Barr Virus erzeugt in Neuweltaffen maligne Lymphome (Shope et al., 1973; Epstein et al., 1973; Wolf et al., 1974). Die Tumorzellen enthalten EBV spezifische Nukleinsäuren und das EBV spezifische Kernantigen EBNA (Wolf et al., 1974; Miller et al., 1976).

Wenn auch die Kette der Befunde lückenlos ist, die das Epstein-Barr Virus als menschliches Tumovirus auszeichnen, so bleiben doch entscheidende Fragen offen. Was geschieht auf molekularer Ebene bei der Zelltransformation? Welche Rolle spielen dabei das Virus und seine Genprodukte? Wie kann ein Virus, das ubiquitär verbreitet und Erreger einer offensichtlich harmlosen Infektionskrankheit ist, ein Tumovirus sein? Wie kann das gleiche Virus drei so völlig verschiedene Krankheiten erzeugen? Wir sind heute noch weit davon entfernt, diese Fragen beantworten zu können. Die Möglichkeit ist denkbar, daß verschiedene EBV-Stämme, also unterschiedliche ätiologische Agentien den verschiedenen Krankheiten zuzuordnen sind. Eine Stammdifferenzierung läßt sich erst auf der Basis einer genauen Kenntnis des Virusgenoms vornehmen. Beim Epstein-Barr Virus stehen wir heute aber diesbezüglich noch völlig am Anfang. Die Ursachen dafür liegen in den Schwierigkeiten, die mit der experimentellen Arbeit mit EB-Viren verbunden sind. Das Hauptproblem ist die geringe verfügbare Menge an Virus, da es kein permissives System gibt, in dem man das Virus in ausreichender Menge züchten kann.

Als Quelle zur Virusisolierung dienen lediglich EBV transformierte Zelllinien, in denen einige Zellen spontan zur Virusproduktion induziert werden (Schulte-Holthausen and zur Hausen, 1970; Adams, 1973). Die Virusproduktion unterliegt darüberhinaus erheblichen Schwankungen unbekannter Ursache, so daß die verfügbare Menge an Virus immer ein limitierender Faktor für biochemische Untersuchungen ist. Da bei der Untersuchung der Zelltransformation und

Tumorinduktion durch das Epstein-Barr Virus so schwerwiegende experimentelle Hindernisse bestehen, erscheint es sinnvoll, die Herpesvirus-induzierte Onkogenese an anderen Primaten-viren zu untersuchen, die experimentell besser handhabbar sind.

Zwei andere für bestimmte Neuweltaffen onkogene Herpesviren, Herpesvirus saimiri (H.saimiri) und Herpesvirus ateles (H.ateles), die wie das Epstein-Barr Virus maligne Lymphome erzeugen, lassen sich gut in Gewebekultur züchten.

Beide Viren wurden erstmals von der Gruppe um Melendez am Primatenzentrum von Harvard isoliert (Melendez et al., 1968, 1972).

H.saimiri ist bei seinem natürlichen Wirt, dem Totenkopffäffchen (Saimiri sciureus), weit verbreitet (Wolfe and Deinhardt, 1972).

Die Primärinfektion im natürlichen Wirt erfolgt inapparent (Falk et al., 1973). Das Virus persistiert in peripheren Leukozyten, aus denen es angezüchtet werden kann (Falk et al., 1972 a, b). Nach Inokulation des H.saimiri in andere Neuweltaffenspecies entwickelt sich jedoch innerhalb weniger Wochen eine maligne lymphoproliferative Erkrankung (Melendez et al., 1969; Wolfe et al., 1971; Laufs and Fleckenstein 1972), die entweder als Lymphom oder als lymphatische Leukämie imponiert und rasch zum Tode führt (Hunt et al., 1970).

H.ateles zeigt hinsichtlich der Pathogenese große Ähnlichkeit mit H.saimiri. Eine Kreuzneutralisation beider Viren ist jedoch nicht

möglich (Melendez et al., 1972). Der natürliche Wirt des H.ateles ist der Spinnenaffe (Ateles geoffroyi, Ateles paniscus; Melendez et al., 1972). Wie das H.saimiri erzeugt es maligne Lymphome in Krallenaffen (Hunt et al., 1972), sein Wirtsbereich unterscheidet sich jedoch vom H.saimiri: In erwachsenen Pinselohrräffchen (Callithrix jacchus) erzeugt nur H.ateles Tumoren, H.saimiri dagegen nicht (Laufs and Melendez, 1973).

Die Infektion von Neuweltaffen mit H.saimiri und H.ateles zeigt weitgehende Ähnlichkeit mit der Epstein-Barr Virus Infektion des Menschen:

1. Epstein-Barr Virus und H.saimiri und H.ateles persistieren in den peripheren Leukozyten beim natürlichen Wirt, ohne daß Viruspartikel nachweisbar sind.
2. Der natürliche Wirt hat in einem hohen Prozentsatz persistierende Antikörper gegen Strukturproteine des Virus.
3. Tumorträger haben besonders hohe Antikörpertiter gegen das entsprechende Virus.
4. Tumorzellen sind frei von Viruspartikeln, jedoch sind virale Nukleinsäuren regelmäßig nachweisbar.
5. Aus Tumoren lassen sich lymphoblastoide Zelllinien anzüchten. Ein Teil dieser Zelllinien produziert einige Zeit nach der Explantation virale Antigene und Viruspartikel (Falk et al., 1972 a).

6. Epstein-Barr Virus und *H. ateles* transformieren Lymphozyten in vitro: Epstein-Barr Virus B-Lymphozyten (Schneider und zur Hausen, 1975), *H. ateles* dagegen Lymphozyten vom T-Typ (Falk et al., 1974). Die Demonstration der transformierenden Aktivität von *H. saimiri* in vitro steht noch aus.

Da *H. saimiri* und *H. ateles*, wie bereits erwähnt, im Gegensatz zum Epstein-Barr Virus gut in Gewebekultur züchtbar sind und biologisch eine nahe Verwandtschaft zum EBV zeigen, bieten sich diese Viren als Modellsystem an, um die Herpesvirus-induzierte Tumorentstehung in Primaten zu untersuchen.

In der Erwartung und Hoffnung, daß sich die an *H. saimiri* und *H. ateles* gewonnenen Erkenntnisse richtungsweisend auf die so mühevoll Arbeit mit dem Epstein-Barr Virus auswirken würden, begannen Fleckenstein und Mitarbeiter, *H. saimiri* und *H. ateles* zu reinigen und ihre DNA zu charakterisieren. Beide Viren erwiesen sich auf molekularer Ebene als nahe verwandt. Beide DNAs zeigten bei der Untersuchung der Dichte in CsCl-Gradienten eine auffällige Heterogenität. Wurde die DNA durch Scherkräfte in kleine Stücke gebrochen, so entstanden Fragmente von sehr unterschiedlicher Dichte, die im intakten Genom offensichtlich kovalent miteinander verbunden waren (Fleckenstein and Wolf, 1974; Fleckenstein et al., 1975; Fleckenstein et al., 1976b). Etwas ähnliches war noch bei keinem anderen Virus beobachtet worden. Eine weitere Besonderheit ergab sich bei der Untersuchung der genetischen Komplexität der schweren und leichten DNA (Fleckenstein et al., 1975; Flecken-

stein et al., 1976b). Es zeigte sich, daß die leichte DNA, die etwa 2/3 des Gesamtgenoms ausmacht, nur aus einer einmal vorkommenden Sequenz besteht. Die schwere DNA beider Viren erwies sich dagegen als hochrepetitiv. Eine kurze Nukleotidsequenz ist demnach, 30-50fach wiederholt, im Virusgenom vorhanden. Neben den Molekülen, die aus schweren und leichten Sequenzen bestehen und wegen ihrer mittleren Dichte in Gleichgewichtsgradienten M DNA genannt wurden, konnten von Fleckenstein et al. (1975) noch Moleküle nachgewiesen werden, die die volle Länge eines Herpesvirusgenoms haben, aber ausschließlich aus repetitiven schweren Sequenzen bestehen. Nach Präzipitation der DNA mit Calciumchlorid konnte diese schwere DNA im Gegensatz zu M DNA in permissiven Zellen keinen cytopathogenen Effekt durch Virusvermehrung auslösen (Fleckenstein et al., 1975). Es handelt sich bei dieser schweren DNA also um defekte Genome.

Über die Struktur des Epstein-Barr Virus Genoms ist vergleichsweise wenig bekannt. Am meisten untersucht wurde das Virus, das von einem Klon (P3HR1) einer lymphoblastoiden Burkitt-Lymphom Zelllinie spontan produziert wird (Hinuma and Grace, 1967; Hinuma et al., 1967). Dieser Klon erwies sich seit seiner Etablierung als relativ guter Virusproduzent. Im günstigen Falle produzieren ca. 5-10% der Zellen der P3HR1-Linie spontan Epstein-Barr Virus, was durch Immunfluoreszenz mit EBV spezifischen Antiseren nachgewiesen werden kann (Henle and Henle, 1966 a). Der Prozentsatz an virusproduzierenden Zellen schwankt und kann nach längerer Subkultivierung auch ganz auf Null absinken. DNA, die aus diesem Virus (P3HR1-Virus) erstmals von Schulte Holthausen und zur Hausen (1970) isoliert

wurde, hat eine Dichte von 1.718 g/ml in CsCl, was einem mittleren Guanin plus Cytosin (G+C) Gehalt von 58% entspricht. Jehn et al. (1972) sowie Pritchett et al., (1975) bestimmten das Molekulargewicht durch Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten in Saccharosegradienten. Das Molekulargewicht von $100-105 \times 10^6$ Dalton, das auch durch Längenmessungen im Elektronenmikroskop bestätigt wurde, entspricht dem anderer Herpesviren (Kieff et al., 1971). Radioaktiv markierte P3HR1 Virus DNA oder ihre komplementäre RNA, die mit E.Coli RNA Polymerase in vitro überschrieben wurde, dienten zum Nachweis EBV spezifischer Nukleinsäuresequenzen in DNA aus einer großen Serie von Burkitt-Lymphom und Nasopharynxcarcinom Biopsien (zur Hausen et al., 1970; Nonoyama et al., 1973).

Die geringe Virusproduktion aller anderen EB-Zelllinien machte vergleichende Untersuchung zur Stammdifferenzierung unmöglich, bis Miller et al. (1972) zeigten, daß mit Epstein-Barr Virus transformierte Krallenaffen-Lymphozyten eine relativ hohe Spontaninduktion zur Virusproduktion aufweisen. Mit einem EBV-Isolat, das ursprünglich aus dem Rachenspülwasser eines Patienten mit infektiöser Mononukleose stammte, erhielten Miller et al. eine Zelllinie (B 95-8) die eine vergleichbare Menge Virus produziert wie P3HR1-Zellen (Miller et al., 1972 ; Miller and Lipman, 1973).

Der Vergleich dieser beiden Viren, P3HR1 und B 95-8 Virus, zeigte einige bemerkenswerte Unterschiede in biologischen Eigenschaften (Miller et al., 1974 a, b). So erwies sich das Virus aus B 95-8 Zellen als ein stark transformierendes Agens, mit dem man in vitro

sehr wirkungsvoll Lymphozyten EBV-sero-negativer Spender in permanent wachsende lymphoblastoide Zellen umwandeln kann. Diese EBV transformierten Zellen enthalten virusspezifische Nukleinsäuren und exprimieren mindestens ein virales Antigen (EBNA). Im Gegensatz zum B 95-8 Virus gelingt es mit dem P3HR1 Virus nicht, Lymphozyten zu transformieren.

Beide Viren unterscheiden sich darüberhinaus in der Fähigkeit, bei Überinfektion von Raji Zellen - das sind Burkitt-Lymphom Zellen, die ca. 50 Virusgenome pro Zelle enthalten, aber keine Viruspartikel und Viruscapsidantigene (VCA) produzieren - einen abortiven Zyklus zu induzieren. Bei Überinfektion der Raji Zellen mit P3HR1 Virus kommt es zur Expression von frühen viralen Antigenen (EA) (W.Henle et al., 1970 b; Gergely et al., 1971; Diehl et al., 1972) und zur Replikation der viralen DNA (Nonoyama and Pagano, 1972a). In einem geringeren Teil werden auch Viruskapsidantigene und Viruspartikel synthetisiert, die sich biologisch bisher als inaktiv erwiesen haben (Yajima and Nonoyama, 1976). Dem B 95-8 Virus fehlt die Eigenschaft völlig, in Raji Zellen EA und einen abortiven Zyklus zu induzieren.

Ein Vergleich der DNA aus B 95-8 und P3HR1 Virus wurde von Pritchett et al. (1975) und Sugden et al. (1976) beschrieben. Demnach ist das Molekulargewicht der DNA beider Viren gleich und beide haben ca. 85-90% ihrer Nukleotidsequenzen gemeinsam. Auf eine weitgehende Homologie schlossen Sugden et al. (1976) auch aus einem Experiment, in dem sie die DNA beider Viren mit einer spezifisch spaltenden Nuklease verdauten und die entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel elektrophoretisch auftrennten.

In den beiden zuletzt genannten Arbeiten wurde EBV DNA untersucht, die aus Viruspartikeln isoliert worden war. Wie schon erwähnt, ist aber die virale DNA in Tumorzellen nicht in Viruspartikel eingepackt. Beim Versuch der Isolierung der viralen DNA aus Tumorzellen steht man also vor einem neuen Problem.

Voraussetzung zur Isolierung der viralen DNA ist die Kenntnis, ob die virusspezifischen Sequenzen in die Zell DNA integriert sind, oder ob sie als extrachromosomales Plasmid vorliegen. Erste Befunde, die darauf deuteten, daß die EBV DNA in Raji Zellen als lineares Plasmid existiert, kamen von Nonoyama und Mitarbeitern (Nonoyama and Pagano, 1972b; Tanaka and Nonoyama, 1974). Adams et al. (1973) hatten dagegen Hinweise dafür - allerdings von einem anderen experimentellen Ansatz ausgehend -, daß EBV DNA Sequenzen in Raji Zellen integriert sind. Neuere Ergebnisse von Lindahl und Mitarbeitern deuten allerdings daraufhin, daß sowohl integrierte wie episomale Virus DNA Sequenzen in Raji Zellen und in Tumorzellen vorhanden sind (Adams and Lindahl, 1975; Lindahl et al., 1976; Kaschka-Dierich et al., 1976).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Struktur der Genome Tumor-erzeugender Herpesviren von Primaten. Im ersten Teil wird die Charakterisierung der DNA von *H.saimiri* und *H.ateles* beschrieben. Es wird gezeigt, wie die repetitiven Sequenzen aufgebaut und im infektiösen M-DNA Molekül angeordnet sind. *H.saimiri* und *H.ateles* DNA werden verglichen und ihre Verwandtschaft beschrieben.

Im zweiten Teil wird die DNA aus P3HR1 und B 95-8 Viruspartikeln untersucht und die Charakterisierung beider DNA Species zur Stammdifferenzierung benutzt.

Der letzte Teil beschäftigt sich mit dem Zustand der EB-Virus DNA in Tumorzellen, ihrer elektronenmikroskopischen Darstellung und dem Vergleich der viralen DNA aus Burkitt-Lymphom Zellen und Nasopharynx-Carcinom Biopsien.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Virus und Zellkulturen

Eulenauffennieren-Zelllinien (OMK), die von Dr. Daniel etabliert waren, wurden verwendet, um H.saimiri und H.ateles in Gewebekultur zu vermehren. Die Zellen wurden in Eagle's Medium (MEM) mit 10% hitzeinaktiviertem foetalem Kälberserum ohne Antibiotika in 8% CO₂-Atmosphäre bei 37° gezüchtet,

H.saimiri-Stämme wurden von Dr. Melendez, Dr. Daniel und Dr. Falk freundlicherweise zur Verfügung gestellt. H.ateles-Stämme stammten von Dr. Daniel. Für die beschriebenen Experimente wurden nur Plaque-gereinigte Viren benutzt.

Virusinfizierte OMK-Zellen wurden nach 2-4 Tagen mit frischem Medium versetzt. Wenn die DNA radioaktiv markiert werden sollte, wurde zu diesem Zeitpunkt 1-15 µCi/ml ³H-Thymidin (spezifische Aktivität 15-25 Ci/mM; Amersham-Buchler) in die Kulturflaschen gegeben. Wenn ein ausgeprägter cytopathogener Effekt sichtbar war (5-20 Tage nach Infektion), wurde das Virus gereinigt. Zum Zeitpunkt der Reinigung enthielt der zellfreie Überstand ca. 1x10⁵ Plaque-formende Einheiten pro ml.

Lymphoblastoide Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% Hitze-inaktiviertem foetalen Kälberserum in Gegenwart von 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycinsulfat bei Temperaturen zwischen 33°C und 37°C gezüchtet. Raji- und P3HR1-Zellen wurden von Dr. Henle, B 95-8-Zellen von Dr. Miller freundlicherweise überlassen. BJAB-Zellen stammten von Dr. G. Klein.

Verozellen wurden in Eagle's Medium (MEM) mit 10% Hitze-inaktiviertem foetalen Kälberserum unter Zusatz von Antibiotika (s.o.) gezüchtet.

2. Reinigung von H.saimiri und H.ateles

Überstand und Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2000 Upm für 10 Minuten getrennt. Aus dem Überstand wurde das Virus im Spinco SW 27 Rotor bei 17000 Upm für 90 Minuten bei 4° angereichert. Das angereicherte Virus wurde in Virussuspensionspuffer (VSB = 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4; 0.01 M KCl; 0.005 M EDTA) mit einem Dounce-Homogenisator fein resuspendiert.

Infizierte Zellen wurden für 3 Stunden in VSB bei 4° suspendiert und dann mit einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Zelldebris wurde durch niedertourige Zentrifugation entfernt.

Angereichertes Virus aus Überstand und Zellen wurde auf 15-30% (w/w) Saccharosegradienten in VSB aufgeschichtet und 30 Minuten bei 20.000 Upm im SW 27 Rotor bei 4° zentrifugiert. Fraktionen zu 20 Tropfen wurden vom Boden des Röhrchens her gesammelt. Radioaktivität wurde in einem Toluol-Szintillator mit 33% (v/v) Triton X 100 bestimmt. Virushaltige Fraktionen wurden vereinigt und das Virus im SW 27 Rotor bei 17000 upm für 90 Minuten bei 4° konzentriert. Viruskonzentrate wurden bei -70° aufbewahrt.

3. Reinigung von Epstein-Barr Virus

Epstein-Barr Virus wurde aus 1.0 - 1.4 l Gewebekulturüberständen nach der von Schulte Holthausen und zur Hausen (1970) beschriebenen Methode gereinigt. P3HR1 und B 95-8 Zellen wurden 2 bis 3 Tage nach Subkultivierung mit $1 \mu\text{Ci/ml } ^3\text{H-Thymidin}$ versetzt. Die Zellen wurden weitere 8-11 Tage bei $33-34^\circ\text{C}$ liegengelassen. Überstand und Zellen wurden durch niedertourige Zentrifugation getrennt. Virus wurde aus dem Überstand in Spinco Typ 19 Rotor bei 18000 Upm für 90 Minuten bei 4° angereichert. Konzentrierung der Virussuspension erfolgte im SW 27 Rotor bei 22000 Upm für 60 Minuten bei 4° . Virus wurde in einem Dounce-Homogenisator in VSB resuspendiert und auf 17-33% (w/w) Saccharosegradienten in VSB mit 0.1% Serumalbumin (BSA) aufgetragen. Die Sedimentation erfolgte über 70 Minuten bei 15000 Upm im SW 25.1 Rotor bei 4°C . Virushaltige Fraktionen wurden durch Zählen der Radioaktivität ermittelt. Konzentration des Virus erfolgte bei 22000 Upm über 60 Minuten bei 4°C im SW 27 Rotor. Viruskonzentrate wurden bei -70°C aufbewahrt. Zur elektronenmikroskopischen Kontrolle wurden die Viruspartikel durch Negativkontrastierung mit 2% (w/v) Phosphorwolframsäure (pH 7.2) dargestellt und in einem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop geprüft.

4. Präparation von viraler DNA

1.8 ml Viruskonzentrat wurde mit 0.2 ml 20% (w/v) Sarkosyl NL versetzt und die Partikel durch einstündige Inkubation bei 60°C lysiert. Die Lysate wurden auf eine konzentrierte CsCl Lösung aufgeschichtet, die durch Lösen von 10g CsCl in 6 ml 20 mM

Tris-HCl, pH 8.5 ; 1 mM EDTA erhalten war (refraktiver Index: 1.4115). DNA wurde in einem Spinco 50 ti Rotor bei 30.000 Upm für 72 Stunden bei 23°C ins Gleichgewicht gefahren.

Fraktionen zu 7 Tropfen wurden durch Anstechen der Gradienten von unten erhalten. Um Scherkräfte gering zu halten, wurde eine 40 x 1.2 mm Nadel benutzt und die Durchflußrate durch Austropfen im geschlossenen System auf $\leq$ 1ml/Minute gedrosselt. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und für 24 Stunden gegen 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM EDTA dialysiert.

5. Präparation zellulärer DNA

Gewebekulturzellen wurden zweimal in isotonem Phosphatpuffer, pH 7.4 (PBS, Dulbecco and Vogt, 1954) gewaschen und anschließend in 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA suspendiert. Zellen wurden lysiert durch Zugabe von 1/10 Volumen 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS). Das Lysat wurde mit Proteinase K (Merck) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml für 60-120 Minuten bei 37°C inkubiert und dann mit 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA-gesättigtem Phenol zwei oder dreimal extrahiert. Nach Entfernen des Phenols durch Dialyse wurde die DNA mit 50 µg/ml RNase (Merck) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend wieder mit Phenol extrahiert und gegen 0.01 M Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM EDTA dialysiert.

6. Radioaktive Markierung von DNA in vitro

Gereinigte Virus DNA wurde in vitro markiert, wobei die Reparaturwirkung des Kornberg-Enzyms (E.coli DNA Polymerase I nach par-

tiellem Verdau der DNA mit pankreatischer DNase (Kelly et al., 1970; Noyama and Pagano, 1973) ausgenutzt wurde. 2.5 µg lyophilisierte Virus DNA wurde in 460 µl 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4; 7 mM MgCl₂; 1 mM Mercaptoaethanol mit 50 ng pankreatischer DNase (Merck) gelöst. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wurden 40 µl KCl zu einer Endkonzentration von 0.15 M zugegeben und die DNase durch Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten inaktiviert. Die Lösung, in der die radioaktive Markierung ausgeführt wurde, enthielt zusätzlich 10 nMol ³H-TTP (spezifische Aktivität 50 Ci/mMol, Amersham-Buchler), je 10 nMol der unmarkierten Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dGTP und dCTP (Merck) und 2.5 Einheiten Kornberg-Enzym, das freundlicherweise von Dr. Schaller zur Verfügung gestellt wurde. Die Markierung erfolgte durch Inkubation über 150 Minuten bei 17°C in einem Endvolumen von 750 µl. Zur Messung der Einbau-kinetik wurden alle 30 Minuten Aliquots zur Messung der säureunlöslichen Radioaktivität entnommen. Die markierte DNA wurde mit puffergesättigtem Phenol extrahiert und anschließend auf einer Sephadex G50-Säule (30 x 0.9 cm) von nicht eingebauten Desoxynukleosidtriphosphaten getrennt, wobei mit 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.01% Sarkosyl eluiert wurde. Die spezifische Aktivität der in vitro markierten DNA betrug 2-3 x 10⁶ Ipm/µg. Die DNA wurde in kleine Portionen abgefüllt und bei -70°C aufbewahrt.

7. In vitro Transkription von viraler DNA

Gereinigte Virus DNA (2-5 µg) wurde in 560 µl Polymerase-Puffer (0.04 M Tris-HCl, pH 7.7; 10 mM MgCl₂; 0.1 mM Dithiothreitol; 0.2 M KCl; 0.05% Rinderserumalbumin, RNase-frei, Serva; 0.4 mM

K₂HPO₄) gelöst. Je 40 nMol ³H-CTP und ³H-UTP (15-20 Ci/mMol, Schwarz-Mann), je 40 nMol unmarkiertes ATP und GTP, sowie 0.1 mg Spermidin wurden zugegeben und mit Überschuß von E.coli RNA Polymerase über 2 1/2 Stunden bei 37°C inkubiert. DNA wurde mit 50 µg/ml DNase (RNase-frei, Merck) zerstört, die RNA mit Puffer-gesättigtem Phenol extrahiert und über Sephadex G50 im Ausschlußvolumen von den nicht eingebauten Nukleosidtriphosphaten getrennt.

8. DNA-RNA-Filterhybridisierung

DNA wurde durch Kochen in 4 ml 0.1 x SSC (1 x SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrat) bei 100° für 10 Minuten denaturiert und im Eisbad abgeschreckt. Durch Zugabe von 1 ml 10 x SSC wurde die Salzkonzentration auf 2 x SSC gebracht und die denaturierte DNA-Lösung langsam auf einer Filterbank auf Nitrocellulosefilter aufgezogen (Sartorius, 0.45 µ). Die Filter wurden über 4 Stunden bei 80°C getrocknet. cRNA wurde in 0.1 x SSC durch Kochen bei 100° für 10 Minuten denaturiert.

Jedes DNA-beladene Filter wurde mit 1 ml cRNA Lösung mit ca. 50000 Ipm in 2.5 x SSC, 50% Formamid und 0.05% SDS über 6 Tage bei 45° inkubiert. Die Filter wurden anschließend mit 2 x SSC gewaschen, mit 20 µg/ml RNase (Merck) für 30 Minuten in 2 x SSC bei 37° inkubiert und nochmals mit 2 x SSC gewaschen. Die noch feuchten Filter wurden im Triton X 100-Szintillator aufgenommen, 10 Minuten bei 4°C kräftig geschüttelt und anschließend gezählt.

9. Reassoziationskinetik

DNA wurde in Portionen von 1 mg lyophilisiert und anschließend in 400 μ l gelöst. Die 400 μ l enthielten: 290 μ l H_2O , 50 μ l NES (NES = 3 M NaCl; 0.1 M EDTA; 0.5% Sarkosyl), 50 μ l 2 N NaOH und 10 μ l in vitro markierte virale DNA. Durch Kochen bei 100° für 10 Minuten wurde die DNA zu Fragmenten von ca. 350 Nukleotiden degradiert. Nach Abkühlen in Eis wurde durch Zugabe von 50 μ l 2 M Tris-HCl, pH 8; und 50 μ l 2N HCl neutralisiert. Da meist eine Trübung auftrat durch lokale Übersäuerung und DNA Präzipitation beim Neutralisieren, wurde nochmals 3 Minuten bei 100°C gekocht und die Proben im Eis abgeschreckt. 50 μ l wurden als Nullwert entnommen, in 0.5 ml 0.14 M Na-Phosphat, pH 6.8 einpipettiert und im Eisbad stehengelassen.

Die Hybridisierungsprobe wurde im Wasserbad bei 67° so inkubiert, daß auch der Luftraum über der Hybridisierungsprobe ins Wasserbad eintauchte, um eine Konzentrationsänderung durch Verdampfung zu vermeiden. Jede Stunde wurden 50 μ l entnommen und in eiskaltes 0.14 M Na-Phosphat, pH 6.8; einpipettiert. Die Reassoziationskinetik wurde gemessen durch Bestimmung des Einzel- bzw. Doppelstranggehaltes der radioaktiven DNA in Abhängigkeit von der Zeit. Die verschiedenen Zeitwerte wurden bei 60° über Säulen, die 0.6 ml Hydroxylapatit enthielten (Biorad, DNA grade) chromatographiert und die einzelsträngige DNA mit 0.14 M Na-Phosphat, pH 6.8; 0.4% SDS, die doppelsträngige DNA mit 0.4 M Na-Phosphat, pH 6.8; 0.4% SDS eluiert. Die Eluate wurden auf gleiche Na-Phosphat-, SDS-Konzentration und

auf das gleiche Volumen von 4 ml gebracht und nach Zugabe von 10 ml Toluol-Triton X 100-Szintillator bei 4° in der Gelphase gezählt. Die Kinetik der Reassoziaton der viralen DNA wurde entsprechend der von Wetmur und Davidson (1968) angegebenen Gleichung dargestellt:

$$\frac{C_0}{C_t} = k_2 t + 1$$

Demnach ist unter den Bedingungen einer Reaktion zweiter Ordnung das Verhältnis von gesamter DNA (C_0) zu einzelsträngiger DNA am Zeitpunkt t (C_t) proportional zur Dauer der Reaktion (t). Die Reaktionskonstante k_2 charakterisiert die Komplexität der vorhandenen DNA-Sequenz. Bei bekanntem k_2 , oder wenn die gleiche DNA in bekannter Konzentration in Vergleichsproben untersucht wird, kann aus der Reassoziationsgeschwindigkeit auf die DNA-Konzentration in einer unbekannten Probe geschlossen werden.

10. Schmelzpunktsbestimmung von DNA-Hybrid-Molekülen

Nach Kreuzhybridisierung von L-DNA aus H.saimiri und H.ateles in Lösung wurden die Einzel- und Doppelstränge auf Hydroxylapatitsäulen getrennt. Die doppelsträngigen Anteile wurden in 0.4 M Na-phosphat, pH 6.8 inkubiert, wobei nach je 2 Minuten Inkubation die Temperatur um 2°C erhöht wurde. Bei jedem Temperaturwert wurde ein Aliquot entnommen, auf 0.14 M Na-phosphat, pH 6.8 verdünnt und über Hydroxylapatit chromatographiert.

Der Schmelzpunkt von H-DNA Hybriden wurde in 0.14 M Na-phosphat, pH 6.8 bestimmt.

11. Präparation viraler DNA für die Elektronenmikroskopie

Doppelsträngige DNA wurde meist nach der von Lang und Mitani (1970) angegebenen Mikrodiffusionsmethode, auch Droplet-Technik genannt, in einer modifizierten Form für die Elektronenmikroskopie präpariert. Die Droplet-Mischung enthielt 240 μ l 2.5 M Ammoniumacetat, pH 7; 30 μ l 0.1 M EDTA, pH 7; 80 μ l 0.01% Cytochrom C (aus einer Stammlösung 1:10 oder mehr verdünnt); DNA in einer Endkonzentration von 5-50 ng/ml und H_2O ad 3.0 ml. Tropfen von 40-50 μ l wurden auf eine Plastik-Petrischale aufgetragen. Nach 30-60 Minuten bei Zimmertemperatur wurde der DNA-Cytochrom C-Film von der Oberfläche der Tropfen mit Parlodion-beschichteten Kupfernetzen abgetupft.

Einzel- und doppelsträngige DNA wurden nach der von Davis et al. (1971) beschriebenen Modifikation der Kleinschmidt-Technik in Gegenwart von Formamid gespreitet. Die Hyperphase enthielt 0.3-0.5 μ g/ml der zu untersuchenden DNA; 0.3 μ g/ml DNA vom Bakteriophagen PM2 als Längenstandard; 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5; 10 mM EDTA; 0.1 mg/ml Cytochrome C (Sigma, No. VI) und 30-40% Formamid. Bei einer einzelnen Spreitung wurden ca. 5 μ l der Hyperphase auf eine Hypophase von 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM EDTA; 10% Formamid gebracht und der sich bildende DNA-Cytochrom C-Film mit Parlodion-beschichteten Kupfernetzen abgetupft.

12. Partielle Denaturierung von DNA

Zur partiellen Denaturierung wurden zwei Methoden benutzt: 1. alkalische Denaturierung (Schnös and Inman, 1970; Inman, 1974) in

Kombination mit der Mikrodiffusionsmethode (Gomez and Lang, .1972) und 2. partielle Denaturierung bei neutralem pH und niedriger Temperatur in Gegenwart von Na-Perchlorat (Delius and Clements, 1976).

Bei der alkalischen Denaturierung wurden 40 μ l DNA (5 μ g/ml) mit 160 μ l alkalischer Denaturierungslösung gemischt und für 5-60 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Die alkalische Denaturierungslösung enthielt: 6.5 ml Na-Karbonat (0.4 g in 130 ml, wasserfrei; 0.5 ml 0.1 M EDTA und 2.6 ml Formaldehyd (38%). Der pH wurde mit 1 N NaOH auf Werte zwischen 11.0 und 11.5 eingestellt. Die partiell denaturierten Moleküle wurden 1:10 in den Droplet-Ansatz, der variierende Mengen Formamid (0-60% v/v) enthielt, hineinverdünnt (Gomez and Lang, 1972).

Bei der zweiten Methode wurden 8 μ l DNA (20 μ g/ml) mit 42 μ l Denaturierungslösung gemischt und 30 bis 60 Minuten bei 30°C oder 32°C inkubiert. Die Denaturierungslösung wurde hergestellt durch Lösen von 33.7 g Na-Perchlorat in 4 ml Phosphatpuffer (0.1 M Na-Phosphat, pH 7,5; 0.01 M EDTA), variierenden Volumina von 38% Formaldehyd (1.14-2.29-3.43-4.57-5.71 ml) und H₂O, das zu einem Endvolumen von 33 ml zugesetzt wurde. Nach Abkühlen im Eisbad wurde Salz und Formaldehyd durch Chromatographie über eine Sephadex G 50 oder G 100 Säule (5 x 0.5 cm in einer Pasteurpipette) entfernt. Die Elution erfolgte mit 4 x 100 μ l 1 mM EDTA, pH 7 und anschließend 3 x 50 μ l. Die beiden ersten Eluate zu je 50 μ l enthielten die DNA und wurden nach der Formamidtechnik (Davis et al. 1971) gespreitet.

13. Elektronenmikroskopie von DNA

DNA-Cytochrom C-Filme wurden mit Parlodion-beschichteten Kupfernetzen von der gespreiteten Oberfläche abgetupft, mit Uranylacetat (Davis et al. 1971) gefärbt und durch Rotationsbedampfung mit Pt/Pd unter einem Winkel von 7° kontrastiert. Die Netze wurden in einem Zeiss EM 10, Siemens 101 oder Philips 301-Elektronenmikroskop betrachtet und bei Vergrößerungen zwischen 4000 und 10.000fach photographiert. Die Vergrößerungseichung erfolgte durch Replica (Zeiss).

14. Längenmessung und Komputernalyse

Längen wurden in Anfangsexperimenten nach 16facher Projektion des Negativs, Nachzeichnen der Moleküle auf Papier und Ausmessen mit einem Landkartenmesser bestimmt. Bei den meisten Experimenten wurde das Längenmeßgerät LM-1 (Brühl, Nürnberg) oder eine XY-Meßbühne verwendet, die an einen Wang (Modell 720)-Rechner angeschlossen wurde.

Einzelstranglängen wurden mit einem Faktor von 0.9 gegenüber Doppelstranglängen korrigiert. Moleküle wurden auf Standardlänge normiert. Die Orientierung der partiell denaturierten Moleküle erfolgte durch optische Kontrolle so, daß möglichst viele charakteristische Regionen von verschiedenen Molekülen an gleichen Positionen lagen. Denaturierungshistogramme wurden mit Hilfe eines Rechenprogramms aufgestellt, das native und denaturierte Bereiche entlang der Denaturierungskarten von vielen einzelnen Molekülen aufsummiert.

15. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von DNA wurden folgende Enzyme benutzt: EcoR I aus *E.coli*, Kpn I aus *Klebsiella pneumoniae*, Sma I aus *Serratia marcescens* und Xba I aus *Xanthomonas badrii*. Kpn I, Sma I und Xba I wurden freundlicherweise von Dr. Mulder zur Verfügung gestellt.

Die Spaltung mit EcoR I (Miles) erfolgte in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂ in einem Volumen von 400 µl bei 37°C über 3 Stunden. In manchen Experimenten war zusätzlich 0.1 M KCl im Ansatz.

Die Inkubationsbedingungen für Kpn I und Xba I waren 6 mM Tris-HCl, pH 7.5; 6 mM MgCl₂; 6 mM Mercaptoäthanol und 15 mM KCl, 3 Stunden bei 37°C.

Spaltung mit Sma I erfolgte in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 5 mM MgCl₂ und 15 mM KCl bei 30°C über 3 Stunden.

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 25 mM gestoppt. 70 µl 3 M Na-Acetat wurden zugesetzt und das Volumen mit H₂O auf 1 ml gebracht. DNA wurde mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und aus der wässrigen Phase mit Äthanol präzipitiert.

16. Äthanolpräzipitation von DNA

Die Äthanolpräzipitation von DNA wurde in Polyallomer-Röhrchen des SW 56 Rotors (Beckman) durchgeführt. Kleine Volumina von DNA wurden mit 70 µl 3 M Na-Acetat versetzt und mit H₂O auf 1 ml ge-

bracht. 2.5 ml Äthanol wurden zugegeben und die Probe nach gründlichem Mischen bei -20°C mindestens 30 Minuten stehengelassen. DNA wurde durch Zentrifugation im SW 56 Rotor bei 35.000 Upm bei 0° über 30 Minuten gesammelt.

Größere Volumina DNA wurden im SW 41 Rotor präzipitiert. Hierbei wurden jeweils die dreifachen Mengen benutzt.

17. Gelelektrophorese von DNA

Plattengele von 3 mm Stärke wurden zwischen angerauhte Glasplatten eines Typ SE 500 oder SE 520 Elektrophoreseapparates (Hoefer Scientific, San Francisco, Calif.) gegossen.

Acrylamidgele enthielten 4-5% (w/v) Acrylamid (Serva, Heidelberg), 0.2-0.25% N'N'-Methylen-Bisacrylamid (Serva) und wurden durch Zugabe von 0.1% TEMED (N,N,N',N'-Tetra-Methylen-Äthylen-Diamin) und 0.1% Ammoniumpersulfat polymerisiert. Agarose (Seakem)-Gele enthielten 0.4-1.2% Agarose in Elektrophoresepuffer (E-Puffer = 40 mM Tris-HCl, pH 7.8 ; 10 mM Na-Acetat und 1 mM EDTA).

Mit Äthanol präzipitierte DNA-Fragmente wurden in 20-40 μl 0.1 x E-Puffer, der 14% (w/w) Saccharose und 0.2 mg/ml Bromphenolblau enthielt, gelöst, in die Geltaschen gefüllt und 10-18 Stunden bei 2-3 Volt/cm laufen gelassen. Nach dem Lauf wurde die DNA im Gel in 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$ Äthidiumbromid in 1 x E Puffer für 30-60 Minuten gefärbt, auf dem Fenster einer UV-Lampe Typ C 51 (UV products,

San Gabriel, Calif.) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera durch ein Rotfilter (Kodak, Wratten No. 23A) fotografiert.

In manchen Experimenten wurde, um die Molarität der einzelnen Fragmente zu bestimmen, die Radioaktivität in jeder Bande bestimmt. Agarose Gelscheiben (0.7%) wurden ausgeschnitten, in 4 ml H₂O bei 120°C aufgenommen und mit 10 ml Toluol-Triton X 100-Szintillator in der Gelphase gezählt.

18. Reinigung von BK-Virus und BK-Virus DNA

Verozellen wurden mit ca. 20.000 hämagglutinierenden Einheiten BK-Virus infiziert. Nach 3-5 Wochen, wenn der cytopathogene Effekt ausgeprägt war, wurden 2 µCi/ml ³H-Thymidin (15-25 mCi/mMol) zugegeben. Nach 4 Tagen wurden die Zellen gefüttert und noch einmal die gleiche Dosis ³H-Thymidin zugesetzt. Nach 10 Tagen wurde BK-Virus gereinigt. Überstand und Zellen wurden durch niedertourige Zentrifugation getrennt. Virus aus dem Überstand wurde bei 30.000 Upm für 2 Stunden bei 4°C im Typ 35 oder 45 ti Rotor sedimentiert.

Virus wurde aus Zellen durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen nach Verdünnen der Zellen in Wasser und durch anschließendes mechanisches Aufbrechen im Dounce-Homogenisator freigesetzt. Zelldebris wurde niedertourig abzentrifugiert. Aus Zellen freigesetztes Virus und Überstand wurden vereinigt und das Virus bei 30.000 Upm für 2 Stunden 4°C im Typ 35 oder 45 ti Rotor angereichert.

Virus wurde gereinigt durch Gleichgewichtszentrifugation in CsCl (mittlere Dichte = 1.34 g/ml) über 40 Stunden bei 4° bei 35.000 Upm in SW 50.1 oder SW 56 Rotor (Lavi and Winocour, 1972). Die sichtbare Virusbande mit vollen Partikeln, die bei 1.34 g/ml CsCl bandete, wurde durch seitliches Punktieren des Röhrchens abgezogen und gegen 0.01 M Tris-HCl, (pH 8.0), 1 mM EDTA dialysiert.

BK-Virus DNA wurde nach der von Tai et al. (1972) für SV 40 DNA angegebenen Methode isoliert. Die dialysierte Virussuspension wurde auf 5.75 ml gebracht und 240 µl 25% SDS zugesetzt. Viruspartikel wurden durch Inkubation bei 37°C über 10 Minuten lysiert. Anschließend wurde 1.01 g CsCl zugegeben und das SDS durch Abkühlen im Eisbad für 10 Minuten ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 3000 Upm über 15 Minuten bei 0° wurde das SDS sedimentiert. Der Überstand wurde abgezogen und mit 5.11 g CsCl versetzt. Dabei sollte das Volumen auf 7.6 ml und die Dichte auf 1.60 g/ml (refraktiver Index: 1.3902) zunehmen. Falls nötig wurde die Dichte auf 1.60 g/ml CsCl korrigiert. Die Lösung wurde in Nitrocellulose-Röhrchen des 50 ti Rotors gebracht und 0.4 ml Äthidiumbromid (6 mg/ml) zugesetzt. Nach Zugabe von Äthidiumbromid wurde die Lösung vor Lichteinwirkung geschützt. Zentrifugation erfolgte im 50 ti Rotor bei 40.000 Upm über 48 Stunden bei 20°. Die Gradienten wurden von unten angestochen und in Fraktionen zu ca. 250 µl gesammelt. Aliquots wurden nach Verdünnen in 4 ml Wasser in Triton-X-100-Szintillator gezählt. Die Form I-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, Äthidiumbromid mit Wasser-gesättigtem Isobutanol 3x extrahiert und die DNA gegen 0.01 M Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM EDTA dialysiert. Die spezifische Aktivität der DNA betrug ca. 15.000-20.000 Ipm/µg.

19. Isolierung von zirkulärer EBV DNA aus Raji Zellen

Rajizellen wurden zweimal in PBS gewaschen. 10^8 Zellen wurden in 20 ml PBS suspendiert und durch Zugabe von 10 ml STE-Puffer (STE = 3% Sarkosyl, 0.075 M Tris-HCl, pH 9.0 ; 0.025 M EDTA) lysiert. Proteinase K (Merck) wurde in einer Endkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Das Durchmischen erfolgte nur durch vorsichtiges Hin- und Herschütten der Probe. Nach Inkubation über 2 Stunden bei 37°C wurde festes CsCl zu einer Enddichte von 1.705 g/ml zugesetzt. Die DNA wurde im 60 ti Rotor über 70 Stunden, 20°C bei 33.000 Upm ins Gleichgewicht zentrifugiert. Die Gradienten wurden durch 40x 1.2 mm Nadeln bei gedrosselter Durchflußrate in 7 Tropfen Fraktionen ausgetropft und die Refraktion sowie die optische Dichte jeder Fraktion bei 260 nm gemessen. Die Fraktionen des Dichtebereichs 1.710-1.730 wurden vereinigt, gegen 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM EDTA dialysiert und durch Einlegen in festes Polyäthylenglykol 20.000 oder 6000 (Serva) eingeeengt.

1-2 ml mit maximal 15 μg DNA wurden auf 36 ml Glyceringradienten (10-30% Glycerin in 1 M NaCl, 0.02 M Tris HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) aufgetragen und 10 Stunden im SW 27 Rotor bei 15.000 Upm, 20° zentrifugiert. Durch Anstechen der Röhrchen von unten mit einer 40 x 1.2 mm Nadel wurden 1 ml Fraktionen (17 Tropfen) gesammelt. Die Fraktionen 6-14 wurden vereinigt, dialysiert und auf 6-8 ml eingeeengt.

Ca. 6000-8000 Ipm BK-DNA Form I wurden als Dichte-Marker zugesetzt. Das Volumen wurde durch Wiegen im Nitrocellulose-Röhrchen des 50 ti Rotors bestimmt. Nach dem Volumen wurde die entsprechende

Menge an CsCl und Äthidiumbromid zugegeben, um eine mittlere Dichte von 1.57 g/ml CsCl und 300 ug/ml Äthidiumbromid zu erreichen:

Ausgangsvolumen [ml]	Menge CsCl [g]	Nach Lösen des CsCl H ₂ O ad [ml]	Volumen Äthidiumbromid (6mg/ml) [ml]
5.95	6.12	7.6	0.4
7.45	7.65	9.5	0.5
8.92	9.18	11.4	0.6

Nach 48 Stunden Zentrifugation bei 40.000 Upm im 50 ti Rotor bei 20° wurden durch eine 40x1.2 mm Nadel Fraktionen zu 8 Tropfen gesammelt. Aliquots zu 25 µl wurden in 4 ml Wasser verdünnt und in Triton X-100-Szintillator gezählt, um die Position von ³H-BK-DNA Form I zu bestimmen. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, wobei nach der schweren Seite hin noch 2 bis 3 Fraktionen hinzugenommen wurden. Nach Extraktion des Äthidiumbromid mit Wasser-gesättigtem Isobutanol wurde die DNA gegen 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM EDTA dialysiert und für das Elektronenmikroskop direkt oder nach Äthanolpräzipitation präpariert.

C. ERGEBNISSE

I. Struktur der DNA onkogener Affen-Herpesviren

1. H.saimiri DNA

H.saimiri DNA enthält in einem Molekül, von dem wieder eine infektiöse Nachkommenschaft ausgehen kann, Sequenzbereiche von sehr unterschiedlicher Dichte (Fleckenstein and Wolf, 1974). Leichte DNA (L-DNA) mit einer Basenzusammensetzung von 36% Guanin plus Cytosin (G+C) und einer Dichte von 1.689 g/ml macht ca. zwei Drittel des Gesamtgenoms aus, wogegen schwere DNA (H-DNA) mit einer Basenzusammensetzung von 71% G+C und einer entsprechenden Dichte von 1.729 g/ml in CsCl ein Drittel des Genoms darstellt. Wie aus kinetischen Untersuchungen durch Messung der Renaturierungsgeschwindigkeit von denaturierter DNA geschlossen wurde, besteht L-DNA aus einmal vorkommenden, H-DNA dagegen aus repetitiven Nukleotid-Sequenzen (Fleckenstein et al., 1975).

Im folgenden werden die Längen der L- und H-Sequenzen und ihre relative Anordnung zueinander im infektiösen M-DNA Molekül untersucht. Die Komplexität der Wiederholungseinheit in den repetitiven H-Sequenzen und die Orientierung der Repetitionen im Molekül werden beschrieben.

a. Größe der L-Region und der H-Wiederholungseinheit

Spaltung von M-DNA mit der Restriktionsendonuklease Sma I aus *Serratia marcescens*, ergab 5 Fragmente (Abb. 1B), von denen das größte im Molekulargewicht erheblich von den übrigen

sehr kleinen Fragmenten differiert.

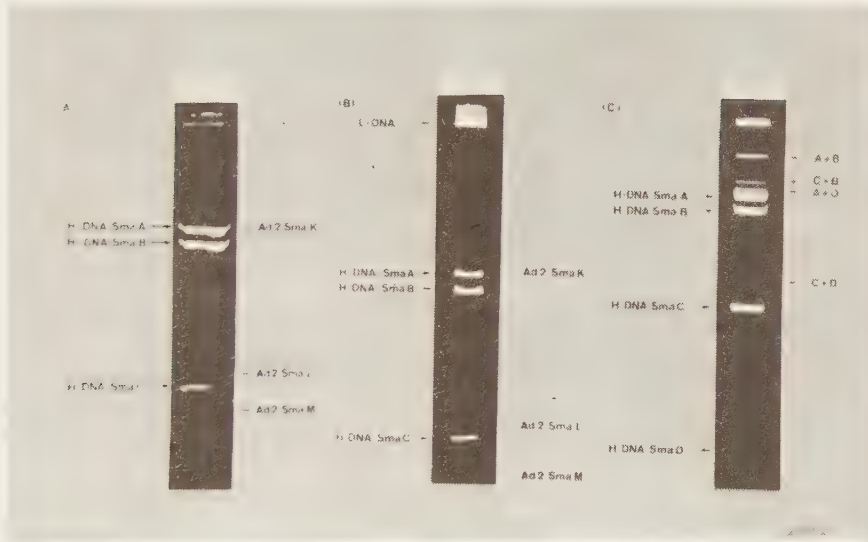


Abb. 1. Gel-Elektrophorese von Sma I-Fragmenten. (A) Komplette Spaltung von H-DNA aus H-Genomen. 5% (w/v) Acrylamid, 12 Stunden, 2.5 V/cm. Fragment D lief aus dem Gel. Spuren von hochmolekularer DNA sind oben auf dem Gel zu sehen. Die Größenmarker: Ad 2 Sma K 380.000; Ad 2 Sma L 140.000, Ad Sma M 110.000. (B) Komplette Spaltung von M DNA. 4% Acrylamid, 16 Stunden, 3 v/cm. Die L Region bildet eine einzige Bande oben auf dem Gel. (C) Unvollständige Spaltung von M-DNA. 4% Acrylamid, 18 Stunden, 2 v/cm.

Koelektrophorese mit intakter Adeno 2 DNA und DNA des Bakteriophagen λ in 0.3-0.5% Agarosegelen ergab, daß diese Bande ein Molekulargewicht über 40×10^6 Dalton haben muß. Dies legte bereits den Schluß nahe, daß die gesamte L-Region im größten Fragment intakt enthalten sei und daß Sma I ausschließlich in

der H-Sequenz spaltet. Aus der bekannten Erkennungssequenz CCCGGG ließ sich zudem eine höhere Spaltungswahrscheinlichkeit in der H-DNA gegenüber der L-DNA ableiten. Daß es sich bei dem großen Fragment tatsächlich um die L-Region handelt, ergab ein Vergleichsexperiment, in dem defekte H-Genome, die ausschließlich aus repetitiven Sequenzen aufgebaut sind (Fleckenstein et al. 1975), mit Sma I gespalten und auf einem 5% Acrylamid aufgetrennt wurden (Abb. 1A). Hier sind in der Position, die die L-DNA in Abb. 1B einnimmt, nur Spuren von DNA zu sehen, die möglicherweise eine geringgradige Kontamination darstellen.

Die Größe der L-Region wurde nach Spaltung von M-DNA mit Sma I durch Vermessung des großen Fragments nach Sichtbarmachung im Elektronenmikroskop bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 2 dargestellt.

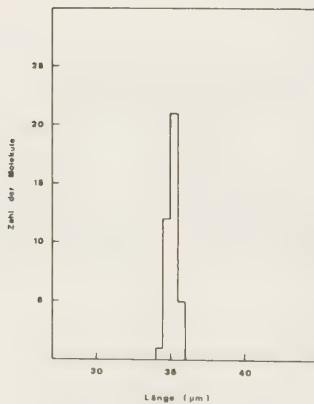


Abb. 2. Histogramm der Länge des hochmolekularen Fragments nach Sma I Spaltung von M-DNA. Das Fragment ist 11,2 mal so lang wie DNA des Phagen PM2. Standard Abweichung ist 1%.

Das Histogramm in Abb. 2 zeigt die homogene Größenverteilung. Die Absolutlänge des großen Fragmentes betrug 11.2 mal die Länge der DNA des Bakteriophagen PM2, die als interner Standard zugesetzt war. Bei einem Molekulargewicht von 6.4×10^6 für PM2 DNA (Pettersen et al, 1973) entspricht dies einem Molekulargewicht von 71.6×10^6 für L-DNA.

Die Größe der H-Wiederholungseinheit entspricht der Summe der Molekulargewicht der kleinen Fragmente, die von Sma I erzeugt wurden. Die Molekulargewichte wurden durch Koelektrophorese mit DNA-Fragmenten bekannter Größe ermittelt. Dabei wurden die Hind II + III Fragmente von SV 40 (Danna et al., 1973), Sma I Fragmente von Adeno 2 DNA (Mulder, persönliche Mitteilung) und die Hind III Fragmente von PM2 DNA (Streck, persönliche Mitteilung) als Größenmarker verwendet. Auf diese Weise ergaben sich die Molekulargewichte 360.000, 300.000, 130.000 und 40.000 für die vier Sma I Fragmente der H-Wiederholungseinheit. Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Banden nach Spaltung von ^3H -Thymidin-markierter M-DNA mit Sma I zeigte auf, daß die vier Banden in äquimolaren Mengen vorliegen, wenn die Voraussetzung zutrifft, daß Thymidin gleichmäßig verteilt in der repetitiven H-Sequenz vorkommt. Das Molekulargewicht der H-Wiederholungseinheit wurde entsprechend mit 830.000 Daltons bestimmt.

b. Anordnung der Fragmente in der repetitiven DNA

Unter den Bedingungen einer unvollständigen Spaltung mit Sma I traten einige neue Banden auf, von denen einige langsamer als

das Sma I A-Fragment wanderten. Die Größenbestimmung der Banden aus der Partialspaltung (Abb. 1C) ergab eindeutig, welche Fragmente einander benachbart sind und klärte damit die Reihenfolge der Fragmente in der Wiederholungseinheit. Wie in Abb. 3 schematisch dargestellt ist, können die Wiederholungseinheiten in repetitiver DNA tandemartig angeordnet sein (Abb. 3B), oder sie können als Inversionen in den repetitiven Sequenzen auftreten (Abb. 3A).

A



B



Abb. 3. Schema der Spaltungsmuster von DNA mit repetitiven Sequenzen. (A) DNA mit Inversionen wird in 4 Fragmente gespalten, wenn jede Wiederholungseinheit zwei Spaltungsstellen enthält. (B) DNA mit in tandem angeordneten Repetitionen ergibt 4 äquimolare Fragmente, wenn jede Wiederholungseinheit 4 Spaltungsstellen hat. Das Muster in (B) wurde experimentell ermittelt. Die Anordnung der Fragmente ging aus der Position der Banden in der Partialspaltung (Abb. 1C) hervor.

Spaltung von repetitiver DNA, die die Wiederholungseinheit zum Teil als Inversion enthält, mit einer Sequenz-spezifischen Nuklease ergäbe vier Fragmente unter der Voraussetzung, daß die Wiederholungseinheit zwei Erkennungsorte für die Nuklease enthielte. In diesem Fall wäre nur ein Fragment vorhanden, das aus jeder einzelnen Wiederholungseinheit stammte (Fragment A in Abb. 3A). Alle anderen Fragmente wären in niedrigerer Molarität vertreten, wobei die Summe der Molaritäten dieser drei submolaren Fragmente (Fragment B, C und D in Abb. 3A) gleich der Molarität des ersten Fragmentes (Fragment A in Abb. 3A) sein müßte.

Die Bestimmung der Molarität der einzelnen Fragmente ergab eindeutig, daß dies nicht so ist. Die Fragmente wurden experimentell in äquimolaren Anteilen gefunden, wie das nach dem in Abb. 3B gezeigten Modell der Tandemanordnung zu erwarten ist. Die Anordnung der Fragmente mit Hilfe der unvollständigen Spaltprodukte ergab zudem die Reihenfolge ADCB-ADCB, die nur mit einer tandemartigen Anordnung der Wiederholungseinheiten vereinbar ist.

∴ Partielle Denaturierung: Anordnung der schweren und leichten Sequenzen in M-DNA

Guanin plus Cytosin (G+C) Basenpaare sind stabiler unter denaturierenden Bedingungen als Adenin Thymin (A+T) Basenpaare, was sich als Abhängigkeit des Schmelzpunktes einer bestimmten DNA von der Basenzusammensetzung ausdrückt (Marmur and Doty, 1962). Da H.saimiri M-DNA Sequenzen

von sehr unterschiedlicher Basenzusammensetzung enthält, läßt sich die unterschiedliche Stabilität der A+T und G+C-Basenpaare ausnutzen, um die H- und L-Sequenzen innerhalb des M-Genoms zu lokalisieren.

Abb. 4 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines partiell denaturierten M-DNA Moleküls.



Abb. 4. Elektronenmikroskopisches Bild von partiell denaturierter M-DNA. Die Pfeile markieren die Übergänge zwischen schweren und leichten Sequenzen.

Offensichtlich enthielt dieses Molekül eine fast vollständig denaturierte A+T reiche Region im Innern des Moleküls, wobei beide Enden - durch Pfeile markiert - nicht einen einzigen Denaturierungsloop enthielten. Demnach enthielten die Enden die G+C-reichen H-Sequenzen und der mittlere, denaturierte Teil entsprach der L-Region. Bei der Analyse einer großen Zahl von Molekülen wurde dieses Muster regelmäßig beobachtet. Dabei ergab sich aber, daß zwar die Länge der L-Region konstant war und bei 35μ lag, jedoch die Längen der beiden nativen Enden stark variierten. Abb. 5 zeigt Histogramme der Längen der doppelsträngigen Enden von 57 partiell denaturierten Molekülen.

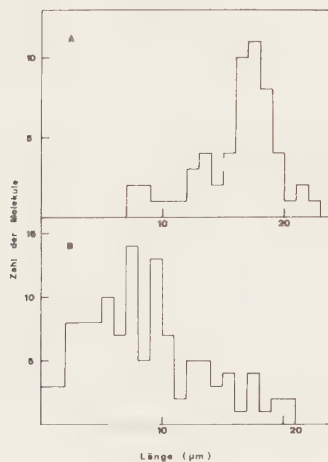


Abb. 5. Histogramme mit der Längenverteilung der einzelnen G+C-reichen Enden von 57 Molekülen (B) und von der Summe beider Enden aus je einem Molekül (A). Die partielle Denaturierung erfolgte durch Alkalibehandlung.

In Abb. 5A sind die Längen beider Enden aus je einem Molekül addiert, in Abb. 5B sind die Längen jedes einzelnen Molekülendes separat aufgeführt. Wie aus Abb. 5B zu ersehen, variierten die Längen der einzelnen Enden von weniger als 1μ bis zu etwa 20μ . Die Gesamtlänge von H-DNA innerhalb eines Moleküls, d.h. die beiden Enden eines Moleküls zusammengekommen, variierte dagegen viel weniger. Offensichtlich haben Moleküle mit einem langen H-Ende an der einen Seite ein kurzes H-Ende auf der anderen, so daß sich eine relativ konstante Gesamtlänge für das M-Genom ergibt. Verglichen mit Phagen DNAs von vergleichbarer Größe, z.B. T4 und T5 DNA ist die Größenverteilung von M-DNA immer noch heterogen. Diese Heterogenität kann mit der Annahme erklärt werden, daß die Wiederholungseinheit der H-Sequenz verschieden häufig an den Enden verschiedener Moleküle aufgereiht sind.

In den meisten Molekülen, in denen die L-Region partiell denaturiert wurde, wurden Einzelstrangbrüche beobachtet. In einigen wenigen Molekülen war jedoch die L-Region ohne einen einzigen Einzelstrangbruch völlig denaturiert, sowohl nach der schonenden Na-Perchlorat Denaturierung als auch nach Alkalibehandlung. Die Zahl der Brüche variierte von Präparation zu Präparation. Somit ergab sich kein Hinweis auf Einzelstrangbrüche oder Alkali-labile Bindungen an definierten Stellen im Molekül.

d. Partielle Denaturierung: Orientierung der L-Region in M-DNA

M-DNA zeigte aufgrund der Sequenzen mit sehr unterschiedlicher

Basenzusammensetzung innerhalb des Moleküls ein zweiphasisches Schmelzverhalten, wobei die Schmelzpunkte der H- und L-Anteile um mehr als 14°C differierten (Fleckenstein et al., 1975). Die Denaturierung des L-Anteils erfolgte jedoch innerhalb eines engen Temperaturbereichs, was auf eine relativ homogene Verteilung G+C und A+T Basenpaare innerhalb der L-Region schließen läßt. Die homogene Verteilung der Basenpaare ist die Ursache dafür, daß die Kartierung der L-Region schwieriger ist als die Differenzierung zwischen H- und L-Sequenzen.

Erst bei einer weitgehenden Denaturierung der L-Region (85-90%) ließ sich zwischen dem linken und rechten Ende des Moleküls unterscheiden (Abb. 6,7).

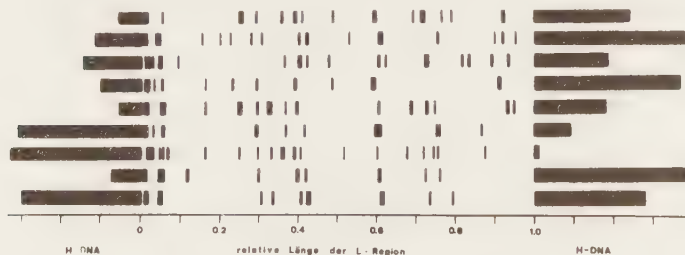


Abb. 6. Parallele Anordnung von 9 partiell denaturierten M-DNA Molekülen. Die L-Region wurde zu 85-90% denaturiert. Die Moleküle wurden mit dem stärker denaturierten Ende der L-Region nach rechts orientiert. Die dunklen Bereiche entsprechen doppelsträngigen, die hellen einzelsträngigen DNA-Ab-schnitten.

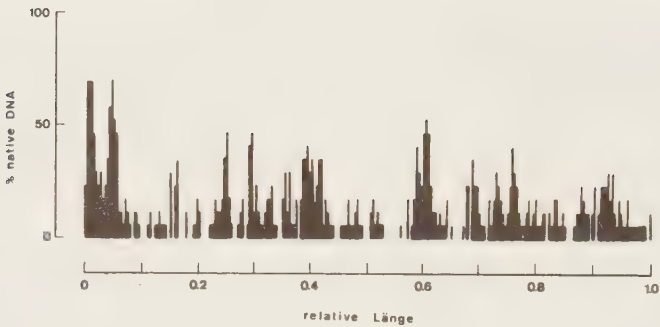


Abb. 7. Denaturierungshistogramm der L-Region von den 9 Molekülen aus Abb. 6.

Unter diesen Bedingungen zeigte das linke Ende der L-Region mehrere kleine Loops, die zwischendrin kurze native DNA-Stücke enthielten. Am rechten Ende dagegen war die L-Region am Übergang zur H-DNA durch große Denaturierungsloops begrenzt. Diese charakteristischen Stellen innerhalb der L-Region erlaubten die Orientierung mehrerer Moleküle zueinander (Abb. 6). Dabei zeigte sich, daß die langen und kurzen H-Enden eines jeden Moleküls beliebig an beiden Seiten der L-Region angeordnet sein können.

2. Struktur von H.ateles DNA

Wie schon erwähnt, zeigen H.saimiri und H.ateles pathogenetisch große Ähnlichkeit. Ziel der folgenden Experimente war es, auch auf molekularer Ebene beide Viren miteinander zu vergleichen. Dabei wurden die gleichen Methoden angewandt, die schon zur

Charakterisierung von *H.saimiri* DNA beschrieben wurden. Als Ausgangspunkt dienten Befunde von Fleckenstein et al.

(1976b) , die zeigten, daß *H.ateles* ebenso wie *H.saimiri* zwei Typen von Genomen enthält: (1) Defekte H-Genome, die nur oder fast nur repetitive G+C-reiche Sequenzen enthalten und (2) M-Genome, die - wie *H.saimiri* M-DNA - zu 2/3 aus L-DNA (38% G+C) und 1/3 aus repetitiven H-Sequenzen (74% G+C) bestehen.

a. Spaltung von *H.ateles* H-DNA mit Sma I

H.ateles H-DNA wurde wie H-DNA aus *H.saimiri* in Fragmente von vier Größenklassen mit niedrigem Molekulargewicht gespalten. Die Molekulargewichte wurden durch Koelektrophorese mit Hind III-Fragmenten von PM2 DNA in 5% Acrylamid ermittelt (Abb. 8).

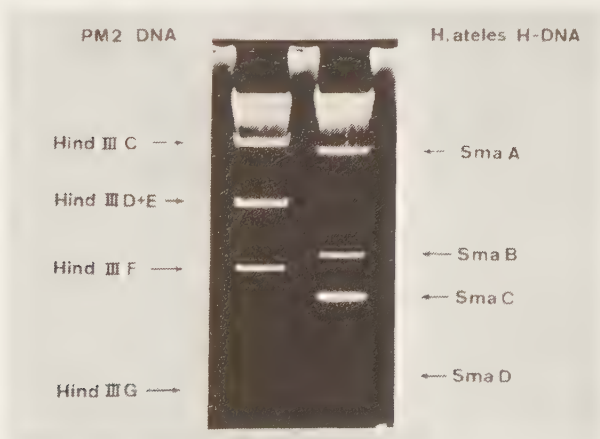


Abb. 8. Gelelektrophorese von Sma I Fragmenten von *H.ateles* H-DNA in 5% (w/v) Acrylamid, 16 Stunden, 2 V/cm. Die Molekulargewichte der PM2-Hind III-Fragmente C-G sind 600.000, 290.000, 280.000, 170.000 und 65.000 (R. Streeck persönliche Mitteilung).

Dabei ergaben sich Werte von 520.000, 190.000, 140.000 und 75.000 (Fragmente A-D). Die Bestimmung der Radioaktivität in jeder Bande machte wahrscheinlich, daß Fragment C, verglichen mit den anderen Fragmenten, in zweifacher Molarität vorkommt. Wenn Fragment C aus zwei gleich wandernden, aber in der Nukleotid-Sequenz verschiedenen Fragmenten besteht, ergibt sich ein Molekulargewicht für die H-Wiederholungseinheit von H.ateles von 1.065.000 Dalton. Alternativ könnte Fragment C doppelt vorhanden sein als Ausdruck von internen Repetitionen innerhalb einer Wiederholungseinheit. In diesem Fall wäre die genetische Komplexität der H-Region kleiner als das Molekulargewicht der H-Wiederholungseinheit.

b. Partielle Denaturierung von H.ateles M-DNA

Die partielle Denaturierung von H.ateles M-DNA soll nur kurz beschrieben werden, weil sich kein wesentlicher Unterschied zur H.saimiri M-DNA ergab. Abb. 9 zeigt ein partiell denaturiertes H.ateles M-Genom. Die L-Region ist auch hier zwischen zwei G+C-reichen repetitiven, in der Länge variierenden Enden in der Mitte des Moleküls angeordnet.

c. Partielle Denaturierung von H.ateles H-Genomen

Hochmolekulare H-Genome, die durch Lysieren der Viruspartikel und anschließende Dichte zentrifugation in CsCl aus dem Dichtebereich > 1.715 g/ml präpariert wurden, wurden in Gegenwart von PM2 DNA partiell denaturiert. Da PM2 DNA einen G+C-Gehalt von 43% hat (Espejo und Canelo, 1968) und somit schwerer

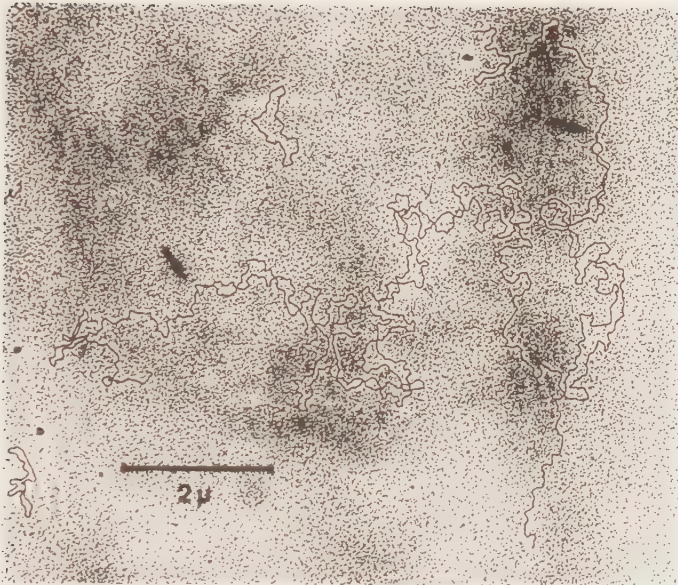


Abb. 9. Elektronenmikroskopisches Bild von partiell denaturierter *H. ateles* M-DNA. Die Pfeile markieren die Übergänge von schweren zu leichten Sequenzen.

denaturierbar ist als die L-Region mit 38% G+C, diente denaturierte PM2 DNA als interne Kontrolle dafür, daß die Denaturierungsbedingungen ausreichend zur kompletten Denaturierung der L-Region waren. Abb. 10 zeigt ein partiell denaturiertes H-Genom. Es ergab sich, daß in die H-Sequenzen offensichtlich noch kurze, leichter denaturierbare DNA-Stücke eingebaut sein können. Ob es sich bei den kurzen L-Sequenzen immer um identische Sequenzen handelt, und ob diese leichten Sequenzen auch im M-Genom repräsentiert sind, ist noch unbekannt.

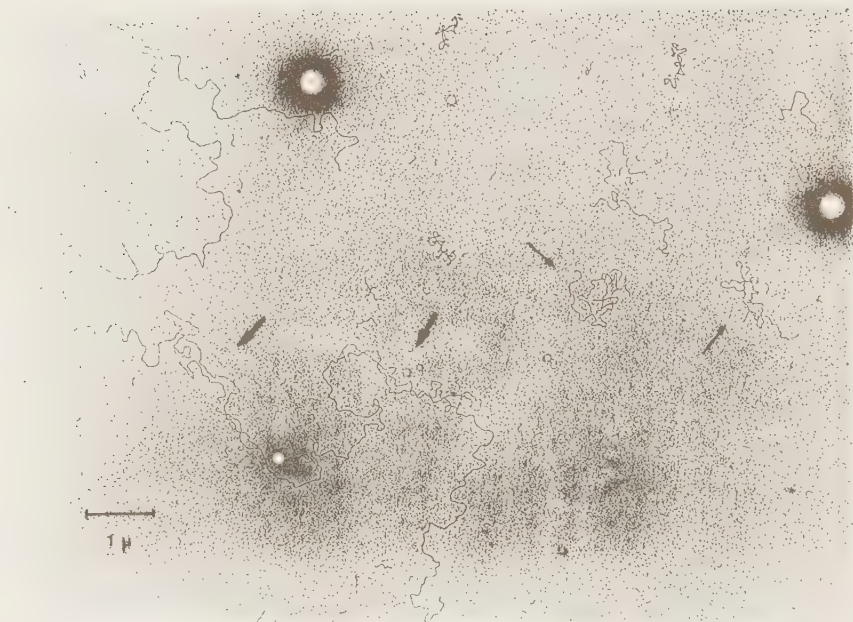


Abb. 10. Elektronenmikroskopisches Bild von partiell denaturierter *H.ateles* H-DNA. Die starken Pfeile deuten auf denaturierte Bereiche. Die schwachen Pfeile markieren fast vollständig denaturierte PM2 DNA Moleküle.

3. Verwandtschaft von *H.saimiri* und *H.ateles*. Homologien zwischen DNA-Sequenzen beider Viren.

Die große biologische Ähnlichkeit von *H.saimiri* und *H.ateles* hat offensichtlich ihre Entsprechung auf molekularer Ebene, wenn man die DNAs beider Viren vergleicht. Das völlige Fehlen einer Kreuzreaktion im Neutralisationstest und die unterschiedliche geographische Herkunft weisen beide jedoch als unterschiedliche Viren aus (Melendez et al., 1972).

Die phylogenetische Verwandtschaft zweier Species kann durch Kreuzhybridisierung der beiden DNAs bestimmt werden. Dabei können die Bedingungen so gewählt werden, daß auch geringe Verwandtschaftsbeziehungen ermittelt werden können. Je größer der Abstand der Hybridisierungstemperatur von den Schmelzpunkten der zu vergleichenden DNAs, desto leichter können sich auch nicht genau identische Basensequenzen zu einem Hybrid finden.

Aus der thermischen Stabilität der gebildeten Hybride kann auf das Ausmaß an falsch gepaarten Basen im Hybrid geschlossen werden, wenn der Schmelzpunkt von homologen, d.h. aus nur einer DNA Species stammenden Hybriden als Vergleichswert herangezogen wird.



Abb. 11. Reassoziationskurven von ^3H -L-DNA aus *H. ateles* (100 ng/ml; 304.000 DPM/ μg) in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ unmarkierter *H. saimiri* L-DNA (●—●—●—●). Die Eigenreassoziationskurve von *H. ateles* L-DNA ist durch (○—○—○—○) charakterisiert.

Abb. 11 zeigt das Ergebnis einer Kreuzhybridisierung von ^3H -markierter L-DNA aus *H.ateles* mit einem Überschuß an kalter L-DNA aus *H.saimiri*. Aus der Kinetik der Reaktion ist ersichtlich, daß ca. 35% der *H.ateles* L-Sequenzen mit L-DNA aus *H.saimiri* unter den Versuchsbedingungen Hybride bildeten. Das inverse Experiment mit ^3H -L-DNA aus *H.saimiri* und kalter *H.ateles* L-DNA brachte das gleiche Ergebnis.

Die Hybridmoleküle wurden über Hydroxylapatitsäulen isoliert, und der Schmelzpunkt gemessen. Als Vergleich dienten homologe Hybride, die sich nach Inkubation von ^3H -L-DNA aus *H.saimiri* mit kalter DNA aus *H.saimiri* infizierten OMK-Zellen gebildet hatten. Wie in Abb. 12 dargestellt, lag der Schmelzpunkt der heterologen *H.saimiri*-*H.ateles* Hybride um 13.5°C unter dem der homologen *H.saimiri*-Hybriden.

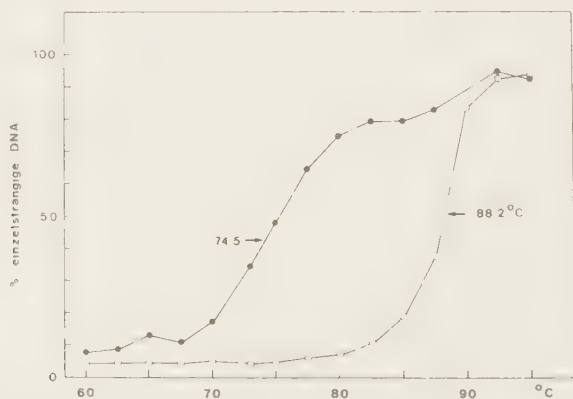


Abb. 12. Schmelzpunktsbestimmung von DNA-Hybriden. Die dunklen Kreise (●—●—●) markieren heterologe *H.saimiri*-*H.ateles* L-DNA-Hybride, die offenen die homologen *H.saimiri*-L-DNA Hybridmoleküle (○—○—○). Die Schmelzkurve der heterologen Hybride ist biphasisch, weil sich unter den Versuchsbedingungen auch ca. 10-20% homologe Hybride bilden.

Nach der Formel von Ullman und McCarthy (1973) senkt 1% falsche Basenpaarung den Schmelzpunkt um 1.5°C . Demnach sind in den kreuzhybridisierenden L-Sequenzen aus *H.ateles* und *saimiri* noch 9% der Basen unterschiedlich.

Die entsprechenden Kreuzhybridisierungen mit H-DNA der beiden Viren ergaben einen geringeren Grad an Homologie. Nur 10% der H-Sequenzen ließen sich in heterologen Hybriden nachweisen. Diese Hybride zeigten eine Schmelzpunktserniedrigung um 20°C gegenüber homologen Hybriden. Innerhalb der kleinen kreuzhybridisierenden Sequenzbereiche divergieren also noch weitere 13% der Basenpaare.

II. Struktur der Epstein-Barr Virus DNA

1. Epstein-Barr Virus DNA aus Viruspartikel

H.saimiri und H.ateles, die beiden bekannten onkogenen Affenherpesviren, lassen sich in Eulenaftenzellen züchten, in denen sie nach 4-14 Tagen einen cytopathogenen Effekt erzeugen und eine reichliche Menge Virus freisetzen. Diese Viren lassen sich aus Zellen und Zellüberständen mit entsprechend guten Ausbeuten reinigen. Ganz anders ist dagegen die Situation beim Epstein-Barr Virus. Es gibt kein lytisches System, in dem das Virus nach Belieben vermehrt werden kann. Die einzige Quelle zur Virusisolierung sind EBV transformierte Zelllinien, die das Virus in sehr geringer, und noch dazu variierender Menge freisetzen. Als vergleichsweise gute Virusproduzenten haben sich zwei Zelllinien, P3HR1 und B 95-8 erwiesen, bei denen meist zwischen 3 und 10% der Zellen Virus produzieren. Die Herkunft der beiden EBV produzierenden Zelllinien ist unterschiedlich. Die P3HR1 Linie stammt von einem Klon einer Burkitt Lymphom Zelllinie (Hinuma et al., 1967). B 95-8 ist eine Krallenaffen-Zelllinie, die durch Transformation von Krallenaffen-Lymphozyten mit einem EB-Virus, das ursprünglich von einem Patienten mit infektiöser Mononukleose stammte, erhalten wurde (Miller et al., 1972). Beide Viren, aus P3HR1 und B 95-8 Zellen, unterscheiden sich in ihren biologischen Eigenschaften. B 95-8 Virus transformiert im Gegensatz zum P3HR1 Virus menschliche Lymphozyten und induziert maligne Lymphome nach Inokulation in Krallenaffen. P3HR1 Virus induziert bei Überinfektion von Raji-

Zellen, einer nicht virusproduzierenden BL-Linie, frühe virale Antigene und die Replikation der viralen DNA, wozu B 95-8 Virus nicht imstande ist. Nach Pritchett et al. (1975) und Sugden et al. (1976) teilen die DNAs beider Viren ca. 90% ihrer Nukleotidsequenzen.

Im folgenden werden die Reinigung der beiden Virusstämme und ihrer DNAs beschrieben. Die partiellen Denaturierungsmuster beider DNAs und die Bandenmuster im Gel nach Spaltung mit spezifisch spaltenden Endonukleasen wurden miteinander verglichen.

a. Virusreinigung

Epstein-Barr Virus wurde aus Gewebekulturüberständen gereinigt (Schulte-Holthausen und zur Hausen, 1970). Abb. 13A, B zeigt das Profil von Radioaktivität auf einem Saccharosegradienten nach ^3H -Thyminmarkierung der Zellen. Die P3HR1 Viruspräparationen hatten meist einen schärferen Gipfel (Abb. 13B) und einen geringeren Hintergrund an Radioaktivität als B 95-8 Viruspräparate. Die hier gezeigten Profile sind durchaus nicht charakteristisch für die Routinearbeit. Nur in den kurzen Phasen einer sehr guten Virusproduktion der Zellen wurden solch gute Virusreinigungen erzielt. Häufig hob sich der Virusgipfel nicht oder kaum vom Hintergrund ab. In Abb. 14 sind die Viruspartikel nach Reinigung aus P3HR1 Zellen elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht.

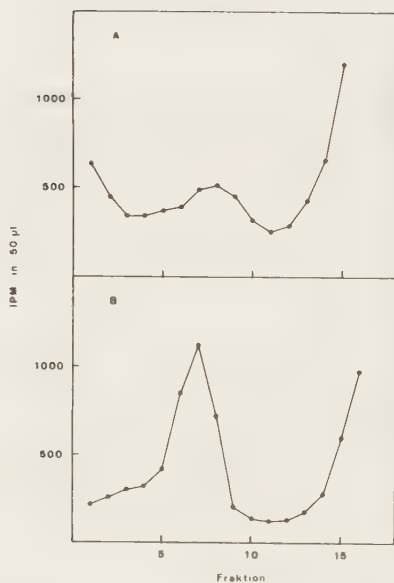


Abb. 13 A,B. Virusreinigungen aus B95-8 (A) und P3HR1 (B) Zell auf 10-33% Saccharose-Gradienten im SW_{25.1} über 70 Minuten bei 15.000 Upm und 4° nach ³H Thymidin Markierung der Zellen.

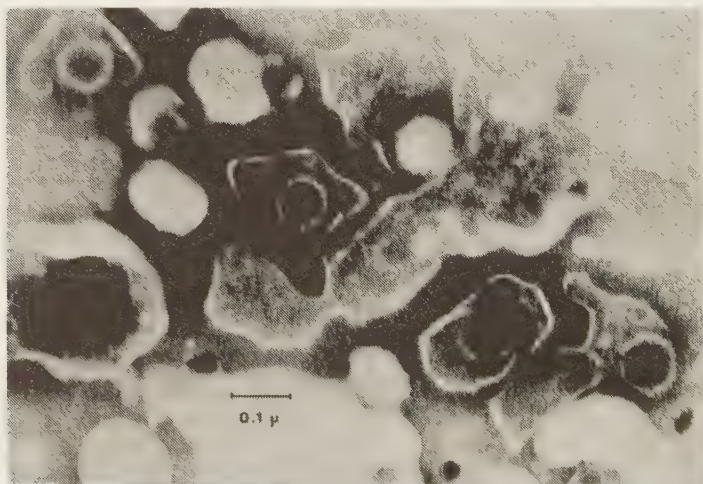


Abb 14. Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten P3HR1 Virus Partikeln. Die einzelnen Kapsomere sind in den Nukleokapsiden zu sehen. Die Hüllen der meisten Viruspartikel sind eingerissen.

b. Reinigung von Epstein-Barr Virus DNA

Präparate von mehreren Virusreinigungen wurden vereinigt, lysiert und die DNA in CsCl ins Gleichgewicht gefahren.

Abb. 15A, B zeigt Beispiele von CsCl Gradienten.

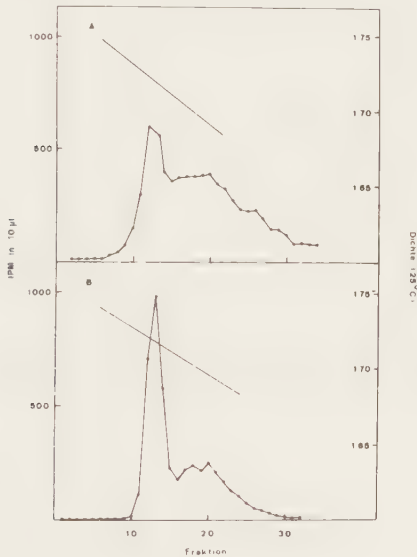


Abb. 15A, B. Gleichgewichtszentrifugation von Lysaten aus B 95-8 Virus (A) und P3HR1 Virus (B) in CsCl bei 30.000 Upm, 20°, 80 Stunden im 50 ti Rotor. B 95-8 Viruslysate enthielten in allen Fällen mehr zelluläre DNA-Kontaminationen.

P3HR1 Virus DNA war demnach in allen untersuchten Fällen wesentlich homogener in der Dichteverteilung (Abb. 15B), was nach der Schärfe der Virusgipfel im Saccharosegradienten auch zu erwarten war (Abb. 13B). B 95-8 Virus DNA enthielt noch eine Menge DNA geringerer Dichte (Abb. 15A). Beim Vereinigen der Virus DNA Fraktionen wurde in allen Fällen beson-

ders darauf geachtet, alle DNA von niederer Dichte abzutrennen, auch auf die Gefahr hin, einen Teil der Virus DNA zu verlieren.

c. Spezifität der Virus DNA

Durch Hybridisierung von radioaktiv markierter viraler DNA mit kalter Zell-DNA wurde die Spezifität und Reinheit der Virus DNA geprüft. Dabei wurden zwei Hybridisierungsmethoden verwandt: Messung der Renaturierungsgeschwindigkeit viraler DNA in Gegenwart von einem großen Überschuß Zell-DNA und Filterhybridisierung von Zell-DNA mit radioaktiver komplementärer RNA (cRNA). Abb. 16 zeigt ein Diagramm, in dem die Renaturierungskinetik von in vitro markierter P3HR1 Virus DNA in Gegenwart von BJAB-, Lachssperma- und Raji DNA dargestellt ist.

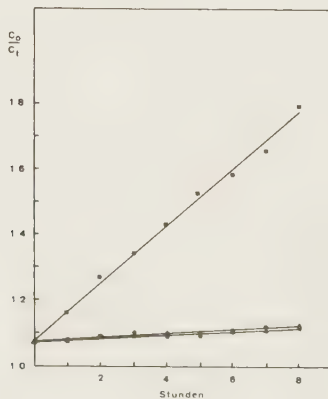


Abb. 16. Reassoziationskinetik von je 5 ng ^3H -markierter P3HR1 Virus DNA (spez. Aktivität: 3×10^6 Ipm/ μg) in Gegenwart von 1 mg Lachssperma DNA (●—●—●) und 1 mg BJAB-DNA (▲—▲—▲). Als positive Kontroll dient 100 μg Raji DNA + 900 μg Lachssperma DNA (■—■—■).

BJAB ist eine EBV negative menschliche B-Zelllinie. BJAB-DNA beschleunigte die Renaturierung der P3HR1 Virus DNA nicht. In der P3HR1 Virus DNA sind somit keine zellulären Sequenzen nachweisbar. Die Renaturierung der radioaktiven P3HR1 Virus DNA in Gegenwart von Raji DNA, die EBV DNA Sequenzen als positive Kontrolle enthält, war deutlich beschleunigt.

Ein zweiter Test auf die Spezifität und Reinheit der Virus DNA war die Filterhybridisierung mit cRNA. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1. Filterhybridisierung mit EBV spezifischer cRNA. Ein Filter enthielt 50 µg denaturierte DNA und wurde mit 50.000 Ipm cRNA hybridisiert. Die Zahlen geben die pro Filter gebundenen Ipm-Werte wieder.

Lachssperma DNA	DNA aus EBNA negativen mensch- lichen Zellen (Pink.)	DNA aus Raji-Zellen	DNA aus einer EBV produziere- nden Zelllinie (Swi.)
33	36	814	3329
41	33	953	3464

Verglichen mit Lachssperma- und Kalbsthymus DNA zeigte DNA aus menschlichem Gewebe keine erhöhte Hybridisierungsrate. Raji DNA und DNA aus einer EBV produzierenden Linie wurden als positive Kontrolle verwendet.

Bei beiden Hybridisierungsmethoden muß eingeräumt werden, daß man eine Kontamination mit repetitiver zellulärer DNA zwar sicher ausschließen kann, jedoch nicht sicher eine Kontamination mit nur einmal vorkommenden zellulären Sequenzen. Eine solche Kontamination erscheint aufgrund der unterschiedlichen Dichte von EBV-DNA und Zell-DNA aber unwahrscheinlich.

B 95-8 Virus DNA erwies sich bei der partiellen Denaturierung als homogen (siehe unten) und wurde deshalb keiner weiteren Reinheitsprüfung unterzogen.

d. Partielle Denaturierung von B 95-8 Virus DNA

95-8 Virus DNA wurde in Na-Perchlorat partiell denaturiert (Abb. 17). Verglichen mit der starken Häufung von A+T und G+C Basenpaaren in H.saimiri und ateles M-DNA, sind die A+T-reichen Einzelstrangregionen viel gleichmäßiger über das Molekül verteilt. In Abb. 18 sind die physikalischen Karten von 14 B 95-8 Virus DNA Molekülen zusammengestellt. Die Moleküle wurden mit ihren A+T und G+C-reichen Regionen in der Orientierung so untereinander angeordnet, daß nach visueller Kontrolle ein jedes Molekül gut zu den übrigen paßte. Das Denaturierungshistogramm, das die Summe der 14 Karten wiedergibt, ist oben in Abb. 18 zu sehen.

Die linke Seite des Moleküls war - verglichen mit der rechten - reicher an G+C Basenpaaren und enthielt drei kleine, aber markante A+T-reiche Regionen. Zwei davon, die nahe benach-



Abb. 17. Elektronenmikroskopische Aufnahme von partiell denaturierter B 95-8 Virus DNA. Die Pfeile markieren die Enden des Moleküls.

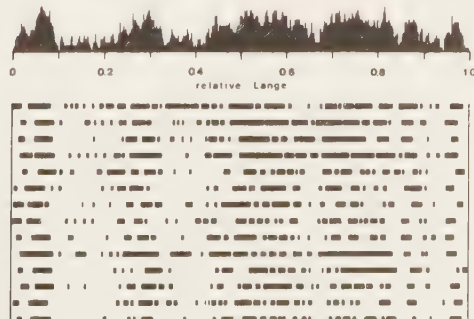


Abb. 18. Lineare Anordnung von 14 partiell denaturierten B 95-8 Virus DNA Molekülen. Die dunklen Stellen entsprechen denaturierten, die hellen Stellen den nativen DNA Abschnitten. Die 14 Denaturierungskarten sind zum Histogramm oben im Bild aufsummiert.

bart waren, lagen in der Nähe des linken Molekülendes (0 bis 0.1 der relativen Länge). Die Distanz bis zum linken Molekülende war offensichtlich nicht konstant. Die dritte A+T-reiche Region (0.23 bis 0.33) lag asymmetrisch innerhalb der G+C-reichen Region (0.1 bis 0.43). Im rechten Teil des Moleküls waren A+T-reiche Sequenzen angehäuft, ohne viel Feinstruktur sichtbar zu machen. Die große Gruppe (von 0.43 bis 0.85) wurde nur durch ein kurzes G+C-reiches Stück unterbrochen (bei 0.67). Das rechte Ende war wieder G+C-reicher (0.85 bis 1.0) und trug eine kleine A+T-reiche Region in der Nähe des Terminus (0.96-0.98). Das native Stück am rechten Terminus war wiederum variabel in der Länge.

Ein Histogramm, das mehr Moleküle als hier gezeigt zur Grundlage hat, läßt keine differenziertere Feinstruktur erwarten. Bei Durchführung dieser Experimente wurde ein vorläufiges Histogramm aus nur 7 Molekülen erstellt. Die Erhöhung auf 14 Moleküle war notwendig, um statistische und experimentelle Fehler zu reduzieren, ergab aber keine weitere Information zur Kartierung.

Aus der partiellen Denaturierungskarte lassen sich drei Schlüsse ziehen: (1) B 95-8 Virus DNA ist homogen nach dem Kriterium der partiellen Denaturierung. (2) Eine terminale Redundanz, wie sie von Adams und Lindahl diskutiert wurde (persönliche Mitteilung), sollte kleiner sein als 5% des Genoms. (3) Inverse Repetitionen, die zu Inversionen großer

Sequenzbereiche wie bei Herpes simplex DNA Anlaß geben (Sheldrick and Berthelot, 1974, Hayward et al., 1975b), wurden nicht beobachtet. Die Denaturierungskarte erlaubt jedoch nicht, kleinere Inversionen von Nukleotidsequenzen im Molekül auszuschließen.

e. Partielle Denaturierung von P3HR1 Virus DNA

Partielle Denaturierung von P3HR1 Virus DNA unter den gleichen Bedingungen erwies sich aufgrund von Einzelstrangbrüchen, die in mehreren DNA-Präparationen zu finden waren, als schwierig. Deshalb wurden die Denaturierungskarten von P3HR1 Virus DNA mit etwas geringer denaturierten Molekülen gebildet. Im Gegensatz zu B 95-8 Virus DNA zeigte P3HR1 Virus DNA kein einheitliches Denaturierungsmuster. 22 von 41 Molekülen ließen sich in eine Gruppe einordnen (Gruppe A, Abb. 19), entsprechend der charakteristischen A+T und G+C Verteilung im linken Teil des Moleküls (0-0.37 der relativen Länge in Abb. 19). In der Nähe des linken Endes fanden sich zwei scharf markierte A+T-reiche Regionen (0.01 bis 0.03 und 0.04 bis 0.1), die nach rechts hin einer großen G+C-reichen Region benachbart waren (0.1-0.38). Die G+C-reiche Region wurde von einer charakteristischen Einzelstrangregion (0.20 bis 0.26) unterbrochen, die allen Molekülen dieser Gruppe zu eigen war. Der rechte Teil zeigte ein weniger deutlich ausgeprägtes Muster mit einer großen A+T-reichen Region (0.37-0.87) und einer kleineren G+C-reichen in der Nähe des rechten Molekülendes (0.87-1.0). Die übrigen 19 Moleküle zeigten nicht die beschriebenen Merkmale der Gruppe A. Sie

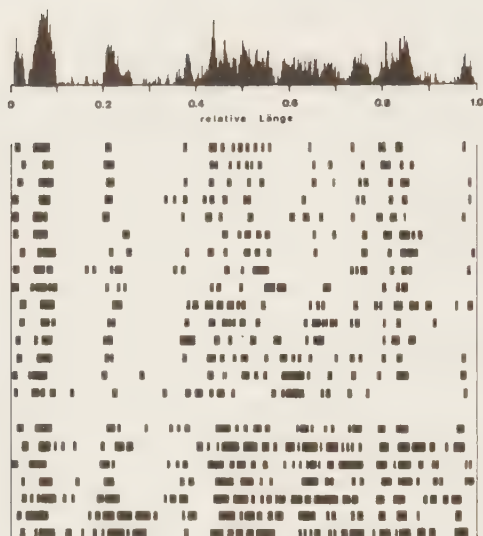


Abb. 19. Von 41 partiell denaturierten P3HR1 Virus DNA Molekülen wurden 22 Moleküle entsprechend gemeinsamer Charakteristika im linken Molekülteil parallel angeordnet. Die dunklen Bereiche bezeichnen denaturierte, die hellen native DNA-Abschnitte. Für das Histogramm wurden die 7 stärker denaturierten Moleküle unten im Bild nicht berücksichtigt.

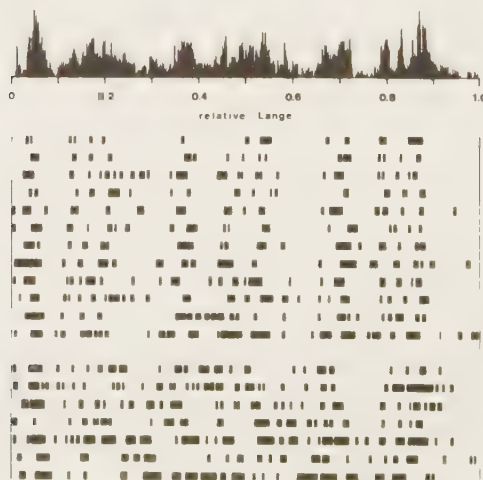


Abb. 20. Denaturierungskarten der restlichen 19 partiell denaturierten P3HR1 Virus DNA Moleküle. Die G-C-reichen Enden wurden rechts parallel angeordnet. Zur Bildung des Histogramms wurden nur die oberen 12 Moleküle, die aus einem Experiment stammten, verwendet.

sind in Abb. 20 zu einem Histogramm zusammengefaßt, obwohl sie möglicherweise eine in sich heterogene Gruppe (Gruppe B) repräsentieren. Sie wurden so angeordnet, daß das G+C-reiche Ende rechts liegt. Eine Strukturbeziehung zwischen den Denaturierungskarten der Gruppe A und B kann nicht hergestellt werden. Nach den Mustern scheint es unwahrscheinlich, daß beide Moleküle identische Sequenzen tragen, die sich nur in ihrer Orientierung unterscheiden.

f. Vergleich der Denaturierungsmuster von P3HR1 und B 95-8 Virus DNA

Von B 95-8 und P3HR1 Virus DNA ist bekannt, daß sie 85-90% ihrer Nukleotidsequenzen gemeinsam haben (Pritchett et al., 1975, Sugden et al., 1976). Leider sind die Denaturierungskarten so wenig detailliert, daß die homologen Sequenzen nicht mit Sicherheit zugeordnet werden können.

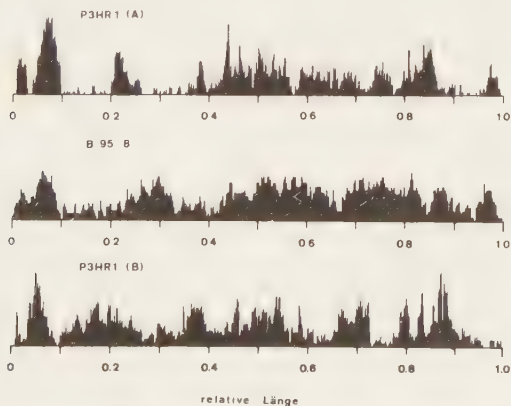


Abb. 21. Vergleich der Denaturierungshistogramme von P3HR1 Virus DNA, Gruppe A (oben), Gruppe B (unten) und B 95-8 Virus DNA (Mitte) aus Abb. 18 bis 20. Zur Orientierung wurden die A+T-reichen Enden links und die G+C-reichen rechts übereinander angeordnet.

Der Vergleich der Histogramme (Abb. 21) erlaubt nur einige vorsichtige Rückschlüsse:

- (1) Eine Korrelation der Denaturierungskarte von B 95-8 Virus DNA mit der P3HR1 Virus DNA Gruppe B ist nicht möglich.
- (2) Gruppe A scheint einige Ähnlichkeiten mit B 95-8 Virus DNA zu haben:

Die A+T-reichen Gruppen am linken Ende (0 bis 0.1 der relativen Länge) sind sehr ähnlich, auch wenn dies durch die Variabilität der Enden etwas verwischt wird.

Die großen G+C-reichen und A+T-reichen Regionen sind etwa gleich groß.

Im G+C-reichen Abschnitt im linken Teil der Moleküle sind in beiden Typen A+T-reiche Einzelstrangbereiche eingeschoben. Relativ zum linken Ende liegen diese an verschiedenen Positionen (0.23-0.33 in B 95-8 und 0.20-0.26 in P3HR1 Virus DNA der Gruppe A). Insertionen und/oder Deletionen von DNA-Stücken in beiden DNAs könnten bewirken, daß die homologen Sequenzen an verschiedenen Stellen in den Molekülen auftreten und dadurch schwerer zu identifizieren sind.

g. Spaltung von B 95-8 und P3HR1 Virus DNA mit den Restriktionsendonukleasen EcoR I, Xba I und Kpn I

Die Spaltung mit Restriktionsenzymen und Analyse der Fragmente hat erheblich zur Aufklärung der Genomstruktur von H.simplex DNA (Wagner et al., 1974; Hayward et al., 1975a,b; Skare et al., 1975; Clements et al., 1976) und der DNA von H.saimiri und H.ateles (Mulder und Fleckenstein, in Vorbereitung) beigetragen. Die Analyse der Genomorganisation erfordert im allgemeinen einige hundert Mikrogramm DNA, eine Menge, die für EBV-DNA aus P3HR1 und B 95-8 Zellen nicht zu bekommen ist. Die geringen zur Verfügung stehenden Mengen EBV-DNA machen diese Art Arbeit mühsam und langwierig.

Für das in Abb. 22 gezeigte 0.4% Agarosegel wurden ungefähr 1 µg von B 95-8 und P3HR1 Virus DNA mit EcoR I gespalten und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Wie schon von Sugden et al. (1976) beschrieben, liefen einige Fragmente beider DNAs im Gel gleich, andere verschieden weit. Die Molekulargewichte der Fragmente wurden durch Koelektrophorese mit DNA-Stücken bekannter Größe ermittelt. Die Molekulargewichte der mit EcoR I gebildeten Fragmente sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Der DNA-Gehalt jeder einzelnen Bande wurde nicht bestimmt. Die Beschreibung der Intensität der Banden in Tabelle 2 entspricht dem optischen Eindurck, der schon deutlich vermittelte, daß die verschiedenen Fragmente nicht in äquimolaren Mengen vorlagen. Im Falle von B 95-8 Virus DNA waren neun schwache Banden zu sehen, das



Abb. 22. Elektrophorese von je ca. 1 μ g DNA aus B 95-8 (B) und P3HR1 (PH) Virus in 0.4% Agarose für 16 Stunden, 2 V/cm nach Spaltung mit EcoR I. Als Größenvergleich dienten λ DNA (30.8×10^6), Adeno 2 DNA (23×10^6), EcoR I Fragmente von Adeno 2 DNA (13.7 ; 2.7 ; 2.3 ; 1.7 ; 1.4 und 1.1×10^6 , die Positionen sind durch Striche gekennzeichnet) und Bam Fragmente von Adeno 2 DNA (9.2 ; 6.9 ; 4.1 und 2.8×10^6 , Positionen sind durch dünne Pfeile markiert).

Muster der P3HR1 Virus DNA war noch komplizierter. Die schwachen Banden blieben auch nach Inkubation in großem Überschuß Enzym sichtbar, was dagegen spricht, daß es sich bei ihnen um Fragmente einer unvollständigen Spaltung handelt.

Tabelle 2. Molekulargewichte der Fragmente von B 95-8 und P3HR1 Virus DNA nach Spaltung mit EcoR I, Kpn I und Xba I ($\times 10^{-6}$). Die auffällig starken und schwachen Banden sind mit (+) bzw. (-) versehen.

Eco R I		Kpn I		Xba I	
B 95-8	P3HR1	B 95-8	P3HR1	B 95-8	P3HR1
27		19		35-40	35-40
24 (-)	24		11.5	30	30
20	20	9.7	9.7	24	
	19	9.5	9.5 (-)		23 (-)
	16.8 (-)		9.1 (-)		19 (-)
15 (-)		8.3			17 (-)
	14 (++)		8.0 (+)		15
	12.8 (-)	7.1		13	13
	12.5 (--)	6.7	6.7		12 (-)
11.5		6.5		11	
	10.5 (--)		6.3	8	8
9.8 (--)			5.7	7.8	
9.5 (-)	9.5 (-)		5.5	7.2	
	8.8 (--)	4.7	4.7	6.8	
8.3 (--)		4.2	4.2		6.7
7.8	7.8		3.9	3.8	3.8
	7.4 (--)		3.1 (+)	3.5	3.5
7.1 (--)	7.1 (--)		2.9		2.9
	6.4 (--)	2.5	2.5	1.1	1.1
6.0 (--)	6.0 (--)	2.4			
5.6	5.6	2.3	2.3		
	5.4	2.0	2.0		
5.0 (-)	5.0	1.8			
4.8 (-)			1.6 (++)		
	4.2		1.5		
4.1		1.1	1.1		
3.6	3.6		0.8 +		
2.7	2.7 (++)		0.6		
	2.1 (++)	0.36	0.36		
	1.9	0.18	0.18		
	1.7	0.15	0.15		
	1.5				
1.4					
	1.3				
	1.0				
	0.8				
	0.7				

Die Erkennungsregion von EcoR I kann in niedrigem Salz, bei hohem pH und bei hoher Enzymkonzentration von 6 auf 4 Basenpaare verkleinert werden, so daß die Spaltungswahrscheinlichkeit zunimmt (sog. EcoR I* Aktivität, Polisky et al., 1975) und neue Banden auftreten können. Die schwachen Banden wurden jedoch auch unter Bedingungen gefunden, in denen EcoR I* Aktivität gehemmt ist. Daraus kann geschlossen werden, daß tatsächlich mehrere submolare Banden in B 95-8 und P3HR1 Virus DNA nach Spaltung mit EcoR I vorhanden sind.

Das Ergebnis der Spaltungen von B 95-8 und P3HR1 Virus DNA mit Xba I und Kpn I ist in Abb. 23 und 24 wiedergegeben. B 95-8 Virus DNA wurde mit Xba I in 11, P3HR1 Virus DNA in 14 Fragmente geschnitten, von denen 5 gleiche Laufstrecken hatten.

Kpn I spaltete B 95-8 Virus DNA in 18, P3HR1 Virus DNA in 24 Fragmente, von denen 11 in gleichen Positionen liefen. Die Molekulargewichte sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Wie in den EcoR I Spaltmustern waren auch nach Xba I und Kpn I Spaltung von P3HR1 Virus DNA schwache Banden zu erkennen. Da der DNA Gehalt der einzelnen Banden nicht quantifiziert werden konnte, wurden die auffällig starken und schwachen Banden in der Tabelle mit einem entsprechenden Vermerk versehen.

Folgende Feststellungen können aus der Analyse der Spaltungsmuster gemacht werden:



Abb. 23. Elektrophorese von je ca. 1 μ g DNA aus B 95-8 (B) und P3HR1 (PH) Virus nach Spaltung mit Xba I und Kpn I in einem Stufengel. Zum Größenvergleich wurden Ad 2-Mix (EcoR I + Bam-Fragmente von Adeno 2 DNA) und Sma Fragmente von Adeno 2 (4.2; 3.5; 2.3; 2.3; 2.2; 2.0; 1.8; 1.7; 1.0; 0.9; 0.7; 0.3; 0.12 und 0.1×10^6) verwendet).

1. Schwach gefärbte Banden waren in allen Spaltmustern von P3HR1, sowie im EcoR I-Muster von B 95-8 Virus DNA nachweisbar.
2. Banden, die auffällig stark erschienen, wurden in allen Spaltungsmustern beobachtet. Es muß aber dahingestellt

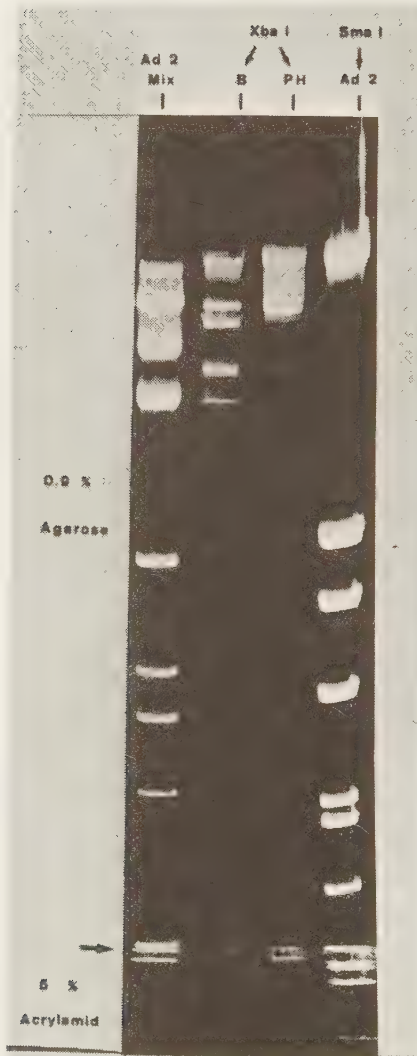


Abb. 24. Elektrophorese von je ca. 1 μ g DNA aus B 95-8 (B) und P3HR1 (PH) Virus nach Spaltung mit Xba I in einem 0.9% Agarosegel. Es wurden die gleichen Größenmarker wie in Abb. 22 und 23 verwendet.

bleiben, ob es sich um zufällig gleich wandernde, sonst aber unterschiedliche Banden, oder um mehrfach auftretende Banden mit identischen Nukleotidsequenzen handelt.

3. Die Spaltungsmuster von B 95-8 Virus DNA mit Xba I und Kpn I zeigten keine weiteren Besonderheiten.
4. Bei Summation der Molekulargewichte der Fragmente ohne Berücksichtigung der Intensität der einzelnen Banden wurde im Falle von EcoR I und Xba I verdauter P3HR1 Virus DNA, sowie nach EcoR I Spaltung von B 95-8 Virus DNA das Molekulargewicht von EBV-DNA von ca. 100×10^6 Dalton bei weitem überschritten.
5. B 95-8 Virus DNA wurde von jedem der drei untersuchten Enzyme in weniger Fragmente gespalten als P3HR1 Virus DNA: von EcoR I in 19 gegenüber 29, von Xba I in 11 gegenüber 14 und von Kpn I in 18 gegenüber 24.

2. Epstein-Barr Virus DNA in transformierten Zellen

In Dünnschnitt-Präparaten von Tumorzellen aus Burkitt-Lymphom- oder Nasopharynx-Carcinom-Biopsien konnten elektronenmikroskopisch nie Viruspartikel beobachtet werden. Wie schon eingangs erwähnt, kann aber in diesen Zellen EB-Virus DNA (zur Hausen and Schulte-Holthausen, 1970; zur Hausen et al., 1970) und ein EBV-spezifisches Kernantigen (EBNA) nachgewiesen werden (Reedman and Klein, 1973; Reedman et al., 1974). Nachdem die Virus DNA in den Tumorzellen offensichtlich nicht in Partikel

eingepackt ist, ist die Frage offen, ob sie als extrachromosomales Plasmid in der Zelle vorliegt oder ob sie in die Zell-DNA integriert ist. Nonoyama und Mitarbeiter zeigten, daß sich der größte Teil der EBV-DNA in alkalischen und neutralen Saccharosegradienten von der Zell-DNA abtrennen ließ und schlossen daraus auf den episomalen Charakter der Virus DNA (Nonoyama and Pagano, 1972b; Tanaka and Nonoyama, 1974). Neuere Ergebnisse von Lindahl und Mitarbeitern machten wahrscheinlich, daß der größere Teil der viralen DNA als Plasmid in der Zelle vorliegt, und daß nur ein Teil der gesamten Virus DNA möglicherweise integriert ist (Adams and Lindahl, 1975; Lindahl et al. 1976; Kaschka et al., 1976).

Hier wird die elektronenmikroskopische Darstellung der viralen DNA aus der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji beschrieben. Die EBV-DNA aus Raji Zellen wurde mit der aus einer Nasopharynx-Carcinom-Biopsie verglichen.

a. EBV-DNA in einer nicht-Virus-produzierenden Burkitt-Lymphom-Zelllinie

EBV-DNA aus Raji-Zellen wurde durch Zentrifugation in CsCl₁, Sedimentation in Glyceringradienten und durch abschließende Zentrifugation in CsCl-Äthidumbromid nach der von Lindahl et al. (1976) angegebenen Methode isoliert. Die Fraktionen, in denen entsprechend dem Dichte-Marker die Virus DNA erwartet wurde, wurden dialysiert und für das Elektronenmikroskop präpariert. Dazu wurde die Mikrodiffusionsmethode

(Lang and Mitani, 1970) oder die Formamid-Spreitung (Davis et al., 1971) nach Anreicherung der DNA durch Äthanolpräzipitation benutzt.

Abb. 25 und 26 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von DNA der entsprechenden Fraktionen.

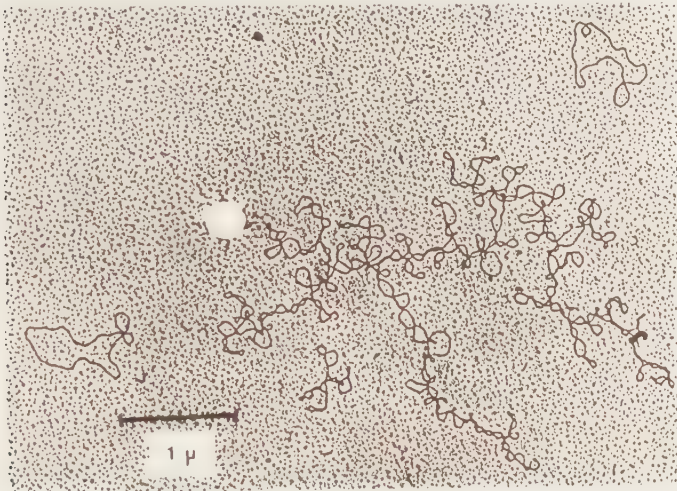


Abb. 25. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines vertwisteten zirkulär geschlossenen EBV-DNA Moleküls aus Raji Zellen. Die kleinen Ringe entsprechen BK-Virus DNA Form I und II.

Abb. 25 beweist, daß es sich hier tatsächlich um verdrehte zirkuläre Moleküle handelt, aus denen durch einen akzidentellen Einzelstrangbruch die Spannung genommen werden kann, wodurch sie in Moleküle mit einer entspannten offenen Konfiguration übergehen (Abb. 26).

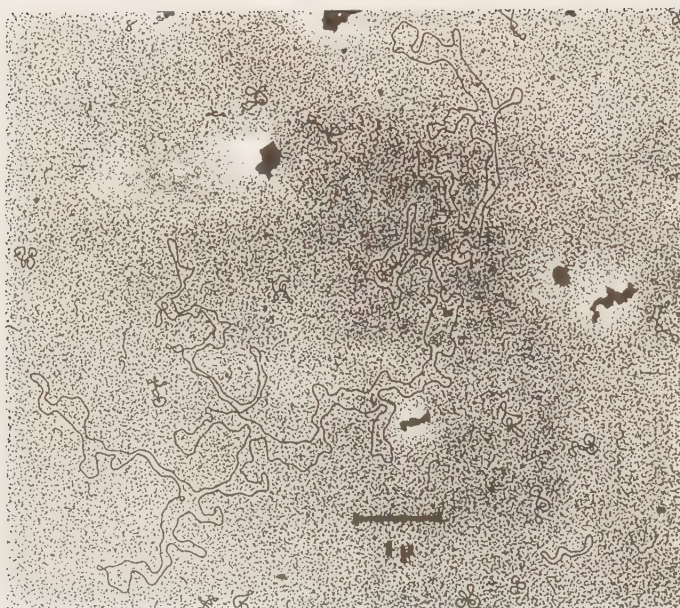


Abb. 26. Elektronenmikroskopisches Bild eines offenen, entspannten EBV-DNA Ringmoleküls aus Raji-Zellen. Die kleinen Ringe entsprechen BK-Virus DNA.

Die Länge von 35 entspannten offenen Zirkeln wurde gemessen. Das Ergebnis ist als Histogramm in Abb. 27A dargestellt. Die zirkulären EBV-DNA Moleküle hatten eine mittlere Länge von 53.0μ bei einer Standardabweichung von 1.7%. 32 PM2 DNA Zirkel, die auf denselben Negativen waren, hatten eine mittlere Länge von 3.2μ bei einer Standardabweichung von 2%. Die EBV-DNA war also 16.6 mal so lang wie PM2 DNA. Legt man ein Molekulargewicht von 6.4×10^6 für PM2 DNA zugrunde (Pettersen et al., 1973), so ergibt sich ein Molekulargewicht von 106×10^6 Dalton für die zirkulären EBV-DNA Moleküle. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit den Molekulargewichten, die für lineare EBV-DNA aus P3HR1 und

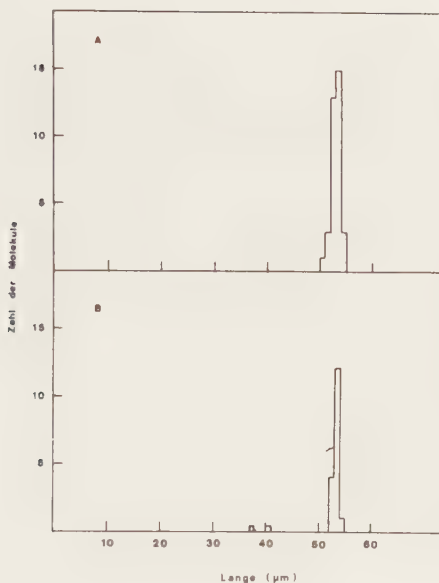


Abb. 27. Größenverteilung von 35 ringförmigen EBV-DNA Molekülen aus Raji-Zellen (A) und von 19 Ringmolekülen aus einer Nasopharynx-Carcinom Biopsie (B). Die mittlere Länge betrug bei beiden 53.0 μ (16.6 mal die Länge von PM2 DNA). In der NPC Biopsie wurden zwei kürzere Ringe (37 und 41 μ) beobachtet.

B 95-8 Viruspartikeln angegeben wurden. Durch Kosedimentation mit T4 DNA wurde für P3HR1 Virus DNA ein Molekulargewicht von $100-101 \times 10^6$ bestimmt (Jehn et al. 1972; Adams and Lindahl, 1975; Pritchett et al. 1975). Pritchett et al. fanden bei elektronenmikroskopischer Untersuchung für lineare P3HR1 und B 95-8 Virus DNA die gleiche Länge (16.5 mal der Länge von PM2 DNA). Die Differenz zu dem hier beschriebenen Wert für die zirkulären EBV DNA Moleküle liegt innerhalb der Fehlergrenze der Methode.

b. Zirkuläre EBV-DNA in Tumorzellen des Nasopharynx Carcinoms

Züchtung von Nasopharynx-Carcinom-Tumorzellen in Gewebekultur ist bisher nicht möglich. G. Klein und Mitarbeitern (1974a) gelang es aber, Nasopharynx-Carcinom-Biopsien in nackte Mäuse, denen der Thymus und damit die zellgebundene Abwehr fehlt, zu implantieren und zum Wachstum zu bringen. Die Tumorzellen ließen sich auf diese Weise vermehren, um genügend Ausgangsmaterial für biochemische Untersuchungen zu bekommen. Aus solchen, in nackten Mäusen gewachsenen Tumoren, wurde von C. Kaschka-Dierich die EBV-DNA in gleicher Weise durch differentielle Zentrifugation isoliert (Kaschka-Dierich et al., 1976), wie das für Raji-Zellen beschrieben ist.

Diese DNA wurde für das Elektronenmikroskop präpariert (Abb. 28). Offensichtlich enthielten die NPC Tumorzellen ebenso wie Raji-Zellen vertwistete zirkuläre Moleküle. Das in Abb. 28 gezeigte Molekül wurde in 4 µg/ml Äthidiumbromid für das Elektronenmikroskop präpariert, wodurch die Verdrillung teilweise aus dem Molekül genommen wurde. Zur Längenmessung wurden aber nur Moleküle in entspannter Konfiguration ohne Äthidiumbromid im Spreitungsansatz verwendet, da der Farbstoff die Konturlänge von DNA vergrößert. Die mittlere Länge von 19 NPC-Ringmolekülen lag bei 53 µ (Abb. 27B). Somit haben die Ringmoleküle aus der Nasopharynx-Carcinom-Biopsie und den Burkitt Lymphom Zellen innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode die gleiche Länge.



Abb. 28. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBV-Ringmoleküls aus einer Nasopharynx-Carcinom-Biopsie. Das Molekül wurde teilweise enttwistet durch Äthidiumbromid ($4 \mu\text{g/ml}$) im Spreitungsansatz zur Mikrodifffusion. Die kleinen Ringe sind PM2 DNA Moleküle in Form II.

Ob dieser Befund auch für die EBV-DNA aus anderen Nasopharynx-Carcinomen Gültigkeit hat, müssen weitere Untersuchungen erweisen. Von Pagano (1974b) wurde aus Reassoziationskinetiken von EBV-DNA in Gegenwart von DNA aus Nasopharynx-Carcinomen geschlossen, daß die EBV-DNA in manchen Tumoren deletiert ist. Deletionen in den hier untersuchten NPC Ringmolekülen könnten höchstens 2-3% des Virusgenoms ausmachen.

D. DISKUSSION

Der Befund, daß Herpesviren in verschiedenen Species einschließlich von Primaten Tumoren erzeugen können, ist inzwischen fest untermauert (zur Übersicht: zur Hausen, 1975). Dennoch sind wir noch weit davon entfernt zu verstehen, welche Rolle die Herpesviren auf molekularer Ebene bei der Tumorentstehung spielen. Wir sind aber soweit, daß wir bestimmte Fragen stellen und Forschungsziele definieren können, von deren Klärung wir uns Einsichten in den molekularen Mechanismus der Herpesvirus-bedingten Krebsentstehung erwarten. Am Anfang stehen dabei die Fragen nach der strukturellen und funktionellen Organisation des Virusgenoms: Wie ist das Genom aufgebaut? Für welche Genprodukte kodiert es? Wie sind die Gene angeordnet?

Erst wenn hierfür die Antworten gegeben sind, können Fragen gestellt werden, die die spezifische Rolle des Virus bei der Zelltransformation und Tumorentstehung betreffen: Welches oder welche der viralen Gene sind zur Tumorinduktion erforderlich? Welche Eigenschaften haben die Genprodukte, die von diesen Genen kodiert werden? Was ist ihre Funktion und wie treten sie in Wechselwirkung mit der Zelle? Wie ist die Expression dieser Gene reguliert?

Unsere Kenntnis über den Wirkungsmechanismus onkogener Herpesviren steht also noch ganz am Anfang. Dem Rechnung tragend beschäftigt sich diese Arbeit ausschließlich mit der Genomstruktur onkogener Herpesviren. Das Epstein-Barr Virus als ein Virus, das mit menschlichen Tumoren assoziiert ist, stand dabei im Vordergrund des Interesses. Aufgrund der großen experimentellen Probleme, die mit der Arbeit an diesem Virus verbunden sind, wurden die onkogenen

Affenviren *H.saimiri* und *H.ateles* mit in die Untersuchung einbezogen. Da diese beiden Viren große Ähnlichkeit in ihrem biologischen Verhalten mit dem Epstein-Barr Virus haben, experimentell aber wesentlich besser zu handhaben sind, wurde erhofft und erwartet, daß von hier wesentliche Impulse für die Arbeit mit dem Epstein-Barr Virus ausgehen.

Die strukturelle Organisation des Genoms der beiden onkogenen Affenviren *H.saimiri* und *H.ateles* erwies sich als sehr ähnlich: im infektiösen M-Genom sind G+C-reiche repetitive H-Sequenzen in variabler Länge an beiden Enden des Moleküls angeordnet. Sie umschließen eine A+T-reiche L-Region, die konstant in der Länge ist, ein Molekulargewicht von ca. 70×10^6 Dalton hat und nur aus einmal vorkommenden Sequenzen aufgebaut ist. Moleküle mit einem langen H-Ende an der einen Seite haben ein kurzes an der anderen Seite, so daß die Molekulargewichte der M-DNA-Moleküle relativ wenig voneinander abweichen.

Die Endonuklease *Sma* I spaltet die repetitiven H-Sequenzen von *H.saimiri* und *H.ateles* in je 4 Banden, aus deren Molekulargewichten sich die Komplexität der Wiederholungseinheiten ergibt. Die H-Repetitionen der beiden Viren sind im Bandenmuster und in der Komplexität verschieden: die in *H.saimiri* DNA ist 830.000, die in *H.ateles* DNA ca. 1.000.000 Dalton.

Der ähnliche strukturelle Aufbau von *H.saimiri* und *H.ateles* DNA warf die Frage nach der phylogenetischen Verwandtschaft der beiden

Viren auf. Der Grad der Homologie der Nukleinsäuren wurde durch Kreuzhybridisierung und durch die Analyse der thermischen Stabilität der Hybride untersucht. Dabei zeigte sich, daß 35% der L-Sequenzen beider Viren kreuzhybridisieren, daß aber von den hybridisierten L-Sequenzen noch 9% falsche Basenpaarung zeigten. Die H-Repetitionen beider Viren zeigten einen geringeren Grad an Homologie als die L-Sequenzen. Nur 10% der H-Sequenzen ließen sich in *H.saimiri*-*H.ateles*-Hybriden finden. Innerhalb der hybridisierten Sequenzen divergierten noch 13% der Basenpaare. Die gefundenen Homologien machen wahrscheinlich, daß beide Viren eine gemeinsame Herkunft haben, sich aber in der Evolution dann so weit auseinander entwickelten, daß Viren mit verschiedenen Oberflächeneigenschaften entstanden, die keine Kreuzreaktion im Neutralisationstest mehr zeigen (Melendez et al., 1972).

Über die Herkunft der repetitiven H-Sequenzen im infektiösen M-Genom ist nichts bekannt. Zwei Möglichkeiten kommen in Betracht, um die Herkunft zu erklären:

1. Die H-Sequenzen von *H.saimiri* und *H.ateles* kommen wie die L-Sequenzen vom gleichen Vorfahren. Die geringere Homologie in den H-Sequenzen könnte darauf deuten, daß in der Evolution weniger Notwendigkeit bestand, die H-Sequenzen zu erhalten.
2. Beide Viren haben die H-Sequenzen unabhängig voneinander von zellulären DNA-Sequenzen aufgenommen. Homologien von H-Sequenzen mit zellulärer DNA von bestimmten Primaten sollten sich in diesem Fall nachweisen lassen. Systematische Unter-

suchung zur Klärung dieser Frage liegen bisher nicht vor.

Über die biologische Funktion der H-Sequenzen ist nichts bekannt. Terminal redundante Sequenzen, wenn auch nicht in so vielfacher Repetition, sind in den DNAs von zahlreichen Bakteriophagen und animalen Viren beobachtet worden. Gleichsinnig angeordnet, machen terminal redundante Sequenzen eine Konkatemerenbildung möglich - das sind lineare Kettenmoleküle, die aus zwei oder mehr einzelnen Molekülen gebildet werden - oder sie gestatten eine Zirkularisierung. Dies ist möglicherweise Voraussetzung für die Replikation linearer doppelsträngiger DNA (Watson, 1972). Auch für die Bildung von zirkulär geschlossenen viralen Plasmiden sind terminal redundante Sequenzen notwendig. Plasmide aus viraler DNA kommen nicht nur - wie hier beschrieben - in EBV transformierten Zellen vor, sondern ließen sich auch in H.saimiri-transformierten Zelllinien, die keine Viruspartikel produzieren, nachweisen (Werner et al., 1976). Ob den viralen Plasmiden, seien es H.saimiri- oder Epstein-Barr Virus-Plasmide, bei der onkogenen Transformation einer Zelle eine entscheidende Rolle zukommt, läßt sich noch nicht absehen. Es ist auch vorstellbar, daß Herpesviren als Plasmide latent in der Zelle persistieren können, ohne daß dies zur Zellschädigung führt. Für die onkogene Transformation müßten dann in das Zellgenom integrierte Virussequenzen verantwortlich gemacht werden.

Zirkularisierung von H.saimiri ist nach Exonuklease III-Behandlung möglich (Delius und Fleckenstein, unveröffentlicht). Hieraus geht hervor, daß die H-Repetitionen an beiden Enden des Moleküls

gleichsinnig angeordnet sind.

Gleichsinnig terminale Repetitionen sind auch in Herpes simplex DNA beobachtet worden (Sheldrick and Berthelot, 1974; Grafstrom et al. 1974, 1975). Die gleichsinnig angeordneten, redundanten Sequenzen können in Herpes simplex DNA offensichtlich auch mehrfach reiteriert am Molekülende vorkommen (Hyman et al. 1976; Skare and Summers, 1976), doch machen diese Sequenzen nur etwa 0.5% des Herpes simplex Genoms aus (Grafstrom et al., 1975), im Gegensatz zu ca. 30% bei H.saimiri und H.ateles.

Den beiden gleichsinnigen, terminal redundanten DNA-Abschnitten liegen in der DNA von Herpes simplex Sequenzen benachbart, die im Innern des Moleküls noch einmal - als Inversionen nebeneinander angeordnet - vorkommen (Sheldrick and Berthelot, 1974; Wadsworth et al., 1975). Die zueinander inversen Sequenzen umschließen dabei je eine Region, die aus nur einmal vorkommenden Sequenzen aufgebaut ist. Diese Sequenzen können in beiden möglichen Orientierungen relativ zu den Molekülenden vorkommen ("Flip-Flop"-Modell, Hayward et al. 1975b, Clements et al., 1976; Skare and Summers, 1976).

Ein solches Modell hätte für H.saimiri und H.ateles nur dann Gültigkeit, wenn man annähme, daß die beobachteten M-DNA-Strukturen selbst schon defekte Moleküle oder Übergänge zu defekten Molekülen darstellten. Die eigentlich infektiösen DNA-Moleküle wären dann in so geringer Konzentration vertreten, daß sie der Analyse entgingen.

Auch wenn sich eine solche Hypothese nicht sicher ausschließen läßt, gibt es doch keine experimentellen Hinweise, die sie unterstützen. Dagegen spricht, daß nach Infektion mit Plaque-gereinigtem Virus oder nach Transfektion mit infektiöser DNA schon nach der ersten Gewebekulturpassage wieder M-DNA-Moleküle mit konstant langen L-Regionen zu finden waren. Dieser Befund, sowie Tumordinduktionsversuche mit isolierter M-DNA bei Affen deuten vielmehr daraufhin, daß die gesamte infektiöse und onkogene Potenz im M-Genom kodiert ist (Fleckenstein et al., 1975; Fleckenstein et al., 1976a).

Die in dieser Arbeit dargestellten Befunde über die DNA von zwei Epstein-Barr Virus-Stämmen lassen sich weder durch die an H.saimiri und H.ateles DNA entwickelten Vorstellungen, noch durch das "Flip-Flop"-Modell von Herpes simplex DNA befriedigend erklären. Die Ergebnisse erlauben noch nicht, ein detailliertes Bild vom Aufbau des Genoms eines der beiden oder beider Virus-Stämme zu entwerfen. Längere repetitive Sequenzen wie in H.saimiri und H.ateles wurden in der DNA beider Virusstämme nicht beobachtet.

Die partielle Denaturierung von B 95-8 Virus DNA ergab ein einheitliches Muster (Abb. 18). Dagegen erwies sich P3HR1 Virus DNA beim partiellen Denaturieren als heterogen. 22 von 41 Molekülen hatten markante Stellen im Molekül gemeinsam und paßten in ein Denaturierungsmuster (Gruppe A, Abb. 19). Den übrigen 19 Molekülen fehlten jedoch charakteristische Merkmale. (A+T) und (G+C) Basenpaare waren relativ regelmäßig über die Moleküle verteilt

(Gruppe B, Abb. 20), sodaß nicht mit Sicherheit entschieden werden konnte, ob es sich hier überhaupt um eine einheitliche Klasse von Molekülen handelt.

In Analogie zu Herpes simplex und unterstützt durch die Tatsache, daß beide Gruppen etwa je die Hälfte der Moleküle enthalten, lag die Vermutung nahe, daß beide Gruppen durch Inversion von Sequenzen miteinander in Beziehung stehen könnten. Aus den hier gezeigten partiellen Denaturierungsmustern ließ sich dafür jedoch kein Hinweis entnehmen, obwohl es bei der Untersuchung von Herpes simplex DNA mit der gleichen Technik ohne Schwierigkeiten möglich war, die identischen Sequenzen in unterschiedlicher Orientierung zu identifizieren (Deliuss and Clements, 1976). Daraus ergibt sich, daß von Herpes simplex abweichende Modelle entwickelt werden müssen, um die divergierenden Denaturierungsmuster in P3HR1 Virus DNA zu erklären. Die beiden Gruppen könnten in verschiedener Weise miteinander in Beziehung stehen:

1. Die möglicherweise heterogene Gruppe B könnte mehrere Reiterationen und/oder Inversionen tragen, die in ihrem Aufbau komplizierter sind als in Herpes simplex DNA. Alle Nukleotidsequenzen, die in Molekülen der Gruppe B auftreten, wären demnach auch in denen der Gruppe A vertreten.
2. Die Gruppe B könnte aus defekten Genomen mit reiterierten und invertierten Sequenzen bestehen.

3. In P3HR1 Zellen ist eine heterogene Viruspopulation von zwei oder mehr Viren vorhanden. Die DNAs der verschiedenen Populationen könnten partielle Homologien zeigen. Jede Gruppe hätte aber Sequenzbereiche, die in der anderen nicht vertreten sind.
4. Mehrere oder alle der genannten Möglichkeiten könnten gleichzeitig zutreffen.

Jede dieser Interpretationen wäre mit den beobachteten Bandenmustern im Gel nach Spaltung von P3HR1 Virus DNA mit Restriktionsnukleasen vereinbar. Ein "Flip-Flop" aber, der wie bei Herpes simplex terminal redundante Sequenzen einbezieht, würde Anlaß zu vier 1/2 und vier 1/4 molaren Fragmenten ergeben, wenn keine Spaltstelle in der inversen Repetition liegt. Die Summe der Molekulargewichte der 1/4 molaren Fragmente wäre dabei doppelt so groß wie die der 1/2 molaren.

In den hier gezeigten Gelen von P3HR1 Virus DNA nach Spaltung mit EcoR I, Kpn I und Xba I sprechen die Zahl, die Positionen und die Intensitäten der schwachen Banden dagegen, daß der P3HR1 Virus DNA das gleiche Strukturprinzip wie Herpes simplex DNA zugrunde liegt.

Die in der partiellen Denaturierung beobachtete Heterogenität von P3HR1 verglichen mit B 95-8 Virus DNA bestätigte sich auch bei Analyse der Spaltungsmuster beider DNAs mit Restriktionsendonucleasen. Folgende Befunde sind in diesem Sinne interpretierbar:

1. P3HR1 Virus DNA wurde von allen untersuchten Enzymen in mehr Fragmente gespälten als B 95-8 Virus DNA: von EcoR I in 29 gegenüber 19, von Kpn I in 24 gegenüber 18 und von Xba I in 14 gegenüber 11.
2. Die Abschätzung der Summe der Molekulargewichte der Banden nach EcoR I und Xba I Spaltung von P3HR1 Virus DNA ergab einen Wert von weit über 100×10^6 Dalton.
3. Besonders starke und schwache Banden waren in allen Spaltungsmustern von P3HR1 Virus DNA zu finden.
4. Die Spaltungsmuster von B 95-8 Virus DNA mit Kpn I und Xba I sind mit der Annahme vereinbar, daß die Virus DNA Population homogen ist.

Für die Interpretation der Bandenmuster, insbesondere der schwachen Banden muß auch in Erwägung gezogen werden, daß die viralen DNAs teilweise methyliert sein könnten, wodurch eine Spaltung an der entsprechenden Stelle unmöglich gemacht würde. Unvollständige Methylierungen in der DNA würden dann bewirken, daß Fragmente in variierenden submolaren Mengen auftreten. So könnten möglicherweise die schwachen Banden in B 95-8 Virus DNA nach Spaltung mit EcoR I erklärt werden (Abb. 22), vorausgesetzt, daß es sich bei ihnen nicht um Produkte einer unvollständigen Spaltung handelt, wogegen die Kontrollversuche sprechen. Alternativ könnten diese schwachen Banden in EcoR I gespaltenen B 95-8 Virus DNA auf eine

sehr geringe Heterogenität auch in diesem Virus hinweisen.

Eine mögliche Heterogenität in B 95-8 Virus DNA wäre aber weit weniger ausgeprägt als in P3HR1 Virus DNA, nachdem sich bei der partiellen Denaturierung und bei der Spaltung von B 95-8 Virus DNA mit Kpn I und Xba I kein Hinweis darauf ergeben hat.

Zwei Arten von Beobachtungen legen eine biologische Heterogenität des P3HR1 Virus nahe:

1. In der Geschichte dieser Zelllinie und der Zelllinie Jijoye, von der der P3HR1 Klon abstammt (Hinuma et al., 1967) wurde neben dem Virus, das in Raji-Zellen EA induziert, noch in geringen Mengen Virus mit transformierenden Eigenschaften beobachtet (W. Henle et al. 1967; Gerber et al., 1969).
2. Wenn man BJAB und Ramos Zellen - das sind menschliche EB-negative Lymphomzellen mit Eigenschaften von B-Zellen (Klein et al., 1974b)- mit P3HR1 Virus überinfiziert, werden zwei EBNA-Typen induziert, die sich fluoreszenzserologisch differenzieren lassen: Ein Teil der Zellen zeigt eine feingranuläre EBNA Fluoreszenz, die übrigen Zellklone eine brillante Färbung (Fresen and zur Hausen, 1976; Fresen et al., 1976).

Es liegt nahe, die von Fresen und zur Hausen aufgezeigte biologische Heterogenität der hier beschriebenen biochemischen Heterogenität zuzuordnen. Ob das berechtigt ist, wird sich aber erst durch die Analyse der viralen Genome nach Klonieren der Zellen mit verschiedenen EBNA-Mustern entscheiden lassen.

Vergleichende Untersuchungen über die DNA von P3HR1 und B 95-8 Virus sind von Pritchett et al. (1975) und Sugden et al. (1976) veröffentlicht worden.

Pritchett et al. (1975) bestimmten die Molekulargewichte der DNA aus beiden Viren und führten mit den DNAs Sättigungshybridisierungen durch. Sie zeigten auf, daß beide DNAs die gleiche Größe von $100-105 \times 10^6$ Dalton haben, daß aber 15% der Sequenzen aus P3HR1 Virus DNA in der aus B 95-8 Virus fehlen. Sie schlossen daraus, daß B 95-8 Virus DNA eine Deletion von 15% und eine Sequenz-Duplikation gleicher Größe hat.

Die hier beobachtete Heterogenität der P3HR1 Virus DNA legt eine andere Interpretation der Hybridisierungsergebnisse nahe. Nehmen wir an, daß P3HR1-Zellen ein zweites Virus enthalten, so ist die Menge an zusätzlichen Sequenzen, die in der Sättigungshybridisierung entdeckt werden, abhängig vom Grad der Homologie der DNA beider Viren und vom Verhältnis, in dem beide Viren in P3HR1-Zellen vorliegen. Eine Heterogenität im P3HR1 Virus könnte also zum selben Ergebnis in der Sättigungshybridisierung führen wie eine Deletion in B 95-8 Virus DNA.

Sugden et al. (1976) beschrieben Spaltungsmuster der DNAs beider Viren mit EcoR I und kamen zu dem Schluß, daß beide DNAs wohl homogen seien und Repetitionen und/oder Inversionen wie Herpes simplex DNA enthielten. Sie schlossen dies aus den Befunden, daß zweimolare wie submolare Fragmente zu finden waren, daß das Molekulargewicht der Summe der Fragmente das bekannte Molekularge-

wicht von EBV-DNA überschritt und daß Fragmente in hoher Molartität fehlten, wie sie in defekter Herpes-simplex-(Frenkel et al., 1975) und H.saimiri-DNA beobachtet worden waren. Sugden et al. fanden nur einige der submolaren Banden, die in dieser Arbeit beschrieben wurden.

Vergleicht man die Gelmuster, so ist die Diskrepanz nicht verwunderlich. Sugden et al. benutzten - aus Mangel an DNA - in vitro radioaktiv markierte DNA (Roberts et al., 1974) und analysierten die Muster durch Autoradiographie.

Für die hier beschriebenen Elektropherogramme wurden größere Mengen DNA eingesetzt und die Fragmente mit Äthidiumbromid gefärbt. Die für das EcoR I Spaltungsmuster in Abb. 22 eingesetzte DNA Menge war sogar so groß, daß die zweit- und die drittgrößte Bande nicht mehr aufgelöst wurden. Wenn weniger DNA pro Gel eingesetzt wurde, ließen sich die beiden großen Fragmente wie bei Sugden et al. auftrennen, die schwachen Banden hoben sich jedoch nicht mehr vom Untergrund ab. Ein experimenteller Unterschied, der für die Differenzen zusätzlich mitverantwortlich sein könnte, liegt zudem darin, daß Sugden et al. neu klonierte Zellen zur Reinigung von P3HR1 und B 95-8 Virus benutzten.

Es ist offenkundig, daß wir bei Untersuchung der Stammdifferenzen verschiedener Epstein-Barr Virus-Stämme noch ganz am Anfang stehen. Die Frage, die sich bei Vergleich eines transformierenden

(B 95-8) und eines nicht-transformierenden Virusstammes (P3HR1) stellt, was nämlich die zur Transformation notwendigen Gene sind und wie ihre Genprodukte aussehen, ist zum jetzigen Zeitpunkt auch noch weit von einer Beantwortung entfernt.

Eine zweite wichtige Frage, die mit der Stammdifferenzierung von Epstein-Barr Virusstämmen verbunden ist, ist die, ob den verschiedenen EBV-assoziierten Erkrankungen, der infektiösen Mononukleose, dem Burkitt Lymphom und dem Nasopharynx Carcinom verschiedene Virusstämme als unterschiedliche ätiologische Agentien zuzuordnen sind. Durch die Isolierung und Charakterisierung der viralen Plasmid DNA aus Tumoren fängt dieses Problem an, einer experimentellen Prüfung zugänglich zu werden. In dieser Arbeit ist mit der Längencharakterisierung der ringförmigen EBV-DNA Moleküle aus einer Burkitt Lymphom-Zelllinie und aus einer Nasopharynx-Carcinom Biopsie ein Anfang in dieser Richtung gemacht.

Es wird Aufgabe der nächsten Zeit sein, die EBV-DNA aus einer repräsentativen Zahl von verschiedenen Tumoren durch Bestimmung der Länge, partielle Denaturierung und Analyse der Fragmente nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen zu charakterisieren, um die Frage nach der pathogenetischen Bedeutung möglicher Stammesunterschiede zu beantworten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Struktur der Genome Tumor-erzeugender Herpesviren wurde vergleichend untersucht.

Herpesvirus saimiri und Herpesvirus ateles, zwei Affenviren, die bei Krallenaffen maligne Lymphome erzeugen, haben viele Strukturmerkmale ihrer DNA gemeinsam. Die Genome (M-DNA) beider Viren bestehen zu ca. einem Drittel aus repetitiven, Guanin-Cytosin-reichen Sequenzen (H-DNA) und zu zwei Dritteln aus nur einmal vorkommenden Adenin-Thymin-reichen Sequenzen (L-DNA). Die repetitiven H-Sequenzen sind beidseits terminal von der L-Region angeordnet. Die L-Region hat eine konstante Länge (35 μ bei H. saimiri), die H-Enden dagegen variieren in der Länge zwischen ca. 20 μ und weniger als 1 μ . Moleküle mit einem langen H-Ende an der einen Seite haben im allgemeinen ein kurzes an der anderen Seite, so daß die Gesamtlänge der Virus DNA mehr oder weniger konstant ist. Die H-DNA-Wiederholungseinheiten haben Molekulargewichte von ca. 1.000.000 Dalton und sind tandemartig im M-Genom angeordnet. 35% der L-Sequenzen und 10% der H-Sequenzen beider Viren zeigen partielle Sequenzhomologien.

Epstein-Barr Virus, das mit zwei menschlichen Tumorerkrankungen, dem Burkitt-Lymphom und dem Nasopharynx-Carcinom, regelmäßig assoziiert ist, unterscheidet sich im Aufbau des Genoms von den onkogenen Affenviren.

Hochrepetitive DNA Sequenzen oder DNA Bereiche mit sehr unterschiedlicher Basenzusammensetzung wurden weder in dem transformierenden (B 95-8) noch in dem nicht-transformierenden Epstein-Barr Virusstamm (P3HR1) beobachtet.

Partiell denaturierte P3HR1 Virus DNA Moleküle lassen sich in mindestens zwei Gruppen einteilen, die sich in ihrem Denaturierungsmuster deutlich voneinander unterscheiden. B 95-8 Virus DNA hat dagegen ein einheitliches Denaturierungsmuster.

Die Bandenmuster nach Spaltung beider DNAs mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI, Kpn I und Xba I deuten ebenso wie die Denaturierungsmuster auf eine ausgeprägte Heterogenität in der P3HR1 Virus Population.

Zirkulär geschlossene Epstein-Barr Virus DNA Moleküle ließen sich aus einer Burkitt-Lymphom-Zelllinie, ebenso wie aus der Biopsie eines Nasopharynx-Carcinoms präparieren und im Elektronenmikroskop sichtbar machen. Die viralen Plasmide aus den Tumorzellen des Burkitt-Lymphoms und des Nasopharynx-Carcinoms haben die gleiche Länge von 53 μ .

Ob die Virus DNA Plasmide aus den Tumorzellen für die Zelltransformation verantwortlich sind, ist noch unbekannt.

F. LITERATURHINWEISE

- Achong, B.G., and Epstein, M.A. (1966). Fine structure of the Burkitt tumor. J. Nat. Cancer Inst., 36, 877-797.
- Adams A. (1973). Concentration of Epstein-Barr virus from cell culture fluids with polyethylene glycol. J. Gen.Virol. 20, 391-394.
- Adams, A., Lindahl, T., and Klein, G. (1973). Linear association between cellular DNA and Epstein-Barr virus DNA in a human lymphoblastoid cell line. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2888-2892.
- Adams, A., and Lindahl T. (1975). Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1477-1481.
- Burkitt, D.P. (1961). Observations on the geography of malignant lymphoma. E. Afr. Med. J. 38, 511-514.
- Burkitt, D.P., and Davies, J. (1961). Lymphoma syndrome in Uganda and tropical Africa. Med. Press 245, 367-369.
- Ciuffo, G. (1907). Innesto positivo con filtrato di verucca vulgare. Giorn. Ital. Mal. Venereol. 48, 12-17.
- Clements, J.B., Cortini, R., and Wilkie, N.M. (1976). Analysis of herpesvirus DNA substructure by means of restriction endonucleases. J. Gen. Virol. 30, 243-256.
- Danna, K.J., Sack, G.H., and Nathans, D. (1973). Studies of simian virus 40 DNA. VII. A cleavage map of the SV40 genome. J. Mol. Biol. 78, 363-376.

- Davis, R.W., Simon, M., and Davidson, N. (1971). Electron microscopy heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. *Methods in Enzymology* 21, Nucleic Acids, Part D, 413-428. L. Grossman and K. Moldave eds. Academic Press, New York and London.
- Delius, H., and Clements, J.B. (1976). A partial denaturation map of herpes simplex virus type 1 DNA: evidence for inversions of the unique DNA regions. *J. Gen. Virol.* 33, 125-133.
- Demissie, A., and Svedmyr, A. (1969). Age distribution of antibodies to EB virus in Swedish females as studied by indirect immunofluorescence on Burkitt cells. *Acta pathol. Microbiol. Scand.* 75, 457-465.
- De Schryver, A., Tribeni, S., Jr., Klein, G., Henle, W., Henle, G., de Thè, G., Clifford, P., and Ho, H.C. (1969). Epstein-Barr virus (EBV)-associated antibody patterns in carcinoma of the post-nasal space. *Clin. Exp. Immunol.* 5, 443-459.
- Diehl, V., Wolf, H., Schulte Holthausen, H., and zur Hausen, H. (1972). Re-exposure of human lymphoblastoid cell lines to Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer* 10, 641-651.
- Dulbecco, R., and Vogt, M. (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Expt. Med.* 99, 167-182.
- Ellermann, V., und Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol., Abs. I (Orig.)* 46, 595.
- Ellermann, V., und Bang, O. (1909). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Z. Hyg. Infekt.* 63, 231.
- Epstein, M.A., and Herdson, P.B. (1963). Cellular degeneration associated with characteristic nuclear fine structural changes in the cells from two cases of Burkitt's malignant lymphoma syndrome. *Brit. J. Cancer*, 17, 56-58.

- Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1, 702-703.
- Epstein, M.A., Hunt, R.D., and Rabin H. (1973). Pilot experiments with EB virus in owl monkeys. I. Reticuloproliferative disease in an inoculated animal. *Int. J. Cancer* 12, 309-318.
- Espejo, R.T., and Canelo, E.S. (1968). Properties of bacteriophage PM2: A lipid containing bacterial virus. *Virology* 34, 738-747.
- Evans, A.S., Niederman, J.C., and McCollum, R.W. (1968). Seroepidemiologic studies of infectious mononucleosis with EB virus. *New Engl. J. Med.* 279, 1121-1127.
- Falk, L.A., Wolfe, L.G., and Deinhardt, F. (1972a). Isolation of H.saimiri from blood of squirrel monkeys. *J. Nat. Cancer Inst.* 48, 1499-1505.
- Falk, L.A., Wolfe, L.G., Hoekstra, J., and Deinhardt, F. (1972b). Demonstration of H.saimiri-associated antigens in peripheral lymphocytes from infected marmosets during in vitro cultivation. *J. Nat. Cancer Inst.* 48, 529-530.
- Falk, L.A., Wolfe, L.G., and Deinhardt, F. (1973). H.saimiri: Experimental infection of squirrel monkeys. *J. Nat. Cancer Inst.* 51, 165-170.
- Falk, L.A., Wright, J., Wolfe, L.G., and Deinhardt, F. (1974). H.ateles: Transformation in vitro of marmoset splenic lymphocytes. *Int. J. Cancer* 14, 244-251.
- Fleckenstein, B., and Wolf, H. (1974). Purification and properties of H.saimiri DNA. *Virology* 58, 55-64.

Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., and Ludwig, H. (1975). Repetitive sequences in complete and defective genomes of H.saimiri. J. Virol. 15, 398-406.

Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., and Werner, F.-J. (1976a). The role of H.saimiri genomes in oncogenic transformation of primate cells. In Comparative Leukemia Research, J. Clemmesen and D. Yohn eds. S. Karger, Basel, Bibl. Haematol. 43, 308-312.

Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., Werner, F.-J., Daniel, M.D., Falk, L.A., Mulder, C., and Delius, H. (1976b). Herpesvirus ateles DNA and its homolgy with Herpesvirus saimiri nucleic acid. J. Virology, zum Druck eingereicht.

Frenkel, N., Jacob, R.J., Honess, R.W., Hayward, G.S., Locker, H., Roizman, B. (1975). Anatomy of herpes simplex virus DNA. III. Characterization of defective DNA molecules and biological properties of virus population containing them. J. Virol. 16, 153-167

Fresen, K.O., and zur Hausen, H. (1976). Establishment of EBNA-expressing cell lines by infection of Epstein-Barr virus (EBV)-genome-negative human lymphoma cells with different EBV strains. Int. J. Cancer 17, 161-166.

Fresen, K.O., Merkt, B., Bornkamm, G.W., and zur Hausen, H. (1976). Heterogeneity of Epstein-Barr virus originating from P3HR1 cells. I. Studies on EBNA induction. Int. J. Cancer, zum Druck eingereicht

Gerber, P., Whang-Peng, J, and Monroe, J.H. (1969). Transformation and chromosome changes induced by Epstein-Barr virus in normal human leukocyte cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63, 740-747.

Gergely, L., Klein, G., and Ernberg, I. (1971b). Appearance of Epstein-Barr virus-associated antigens in infected Raji cells. Virology 45, 10-21.

- Goldman, M., Reisker, J.I., and Bushar, H.F. (1968a). Serum antibodies to Burkitt cell virus. *Lancet* 1, 1156.
- Gómez, B., and Lang, D. (1972). Denaturation map of bacteriophage T7 DNA and direction of DNA transcription. *J. Mol. Biol.* 70, 239-251.
- Grafstrom, R.H., Alwine, J.C., Steinhart, W.L., and Hill, C.W. (1974). Terminal repetitions in herpes simplex virus type 1 DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 679-681.
- Grafstrom, R.H., Alwine, J.C., Steinhart, W.L., and Hyman, R.W. (1975). The terminal repetition of herpes simplex virus DNA. *Virology* 67, 144-157.
- Gross, L. (1951). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy, with Ak-leukemic extracts, or Ak embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76, 27-32.
- Hayward, G.S., Frenkel, N., and Roizman, B. (1975a). Anatomy of herpes simplex virus DNA: strain differences and heterogeneity in the location of restriction endonuclease cleavage sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1768-1772.
- Hayward, G.S., Jacob, R.J., Wadsworth, S.C., and Roizman, B. (1975b). Anatomy of herpes simplex virus DNA: Evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 4243-4247.
- Henle, G., and Henle, W. (1966a). Immunofluorescence in cells derived from Burkitt lymphoma. *J. Bacteriol.* 91, 1248-1256.
- Henle, G., and Henle, W., (1966b). Studies on cell lines derived from Burkitt's lymphoma. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 29, 71.

- Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 94-101.
- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G.W., Kirya, B.G., Klein, G., Morrow, R.H., Nunube, G.M.R., Pike, M.C., Tukein, P.M., and Ziegler, J.L. (1969). Antibodies to EB virus in Burkitt's lymphoma and control groups. J. Natl. Cancer Inst. 43, 1147-1157.
- Henle, G., Henle, W., Klein, G., Gunvén, P., Clifford, P., Morrow, R.H. and Ziegler, J.L. (1971). Antibodies to early Epstein-Barr virus-induced antigens in Burkitt's lymphoma. J. Natl. Cancer Inst. 46, 861-871.
- Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., zur Hausen, H., and Henle, G. (1967). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. Science 157, 1064-1065.
- Henle, W., and Henle, G. (1970). Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Bibl. Haematol. 36, 706-713.
- Henle, W., Henle, G., Ho, H.C., Burtin, P., Cachin, Y., Clifford, P., de Schryver, A., de Thé, G., Diehl, V., and Klein, G. (1970a). Antibodies to EB virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms and control groups. J. Natl. Cancer Inst. 44, 225-231.
- Henle, W., Henle, G., Zajac, B.A., Pearson, G., Waubke, R., and Scriba, M. (1970b). Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. Science 169, 188-190.
- Henle, W., and Henle, G. (1973). Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis. N. Engl. J. Med. 288-264.

- Henle., W., and Henle. G. (1974). Epstein-Barr virus and human malignancies. *Cancer* 34, 1368-1374.
- Hinuma, Y., and Grace, J.T., (1967). Cloning of immunoglobulin-producing human leukemic and lymphoma cells in long-term cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 124, 107-111.
- Hinuma, Y., Konn, M., Yamaguchi, J., Wudarski, D., Blakeslee, J., and Grace, J. (1967). Immunofluorescence and herpes type virus particles in the P3HR1 Burkitt lymphoma gene. *J. Virol.* 1, 1045-1051.
- Hirshaut, Y., Glade, P., Moses, H., Manaher, B., and Chessin, L. (1969). Association of herpes-like virus infection with infectious mononucleosis. *Am. J. Med.* 47, 520-527.
- Ho, H. (1972). Current knowledge of the epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. In: *Oncogenesis and Herpesvirus* (P.M. Biggs, G. de Thé, and L.N. Payne, eds.), pp. 357-366, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Hunt, R.D., Melendez, L.V., King, N.W. et al. (1970). Morphology of a disease with features of malignant lymphoma in marmosets and owl monkeys inoculated with H.saimiri. *J. Nat. Cancer Inst.* 44, 447-465.
- Hunt, R.D., Meléndez, L.V., Garcia, F.G., and Trum, B.F. (1972). Pathologic features of herpesvirus atelous lymphoma in cotton-topped marmosets (*saguinus oedipus*). *J. Nat. Cancer Inst.* 49, 1631-1639.
- Hyman, R.W., Burke, S., and Kudler, L. (1976). A nearby inverted repeat of the terminal sequence of herpes simplex virus DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 68, 609-615.

- Inman, R.B. (1974). Denaturation mapping DNA. Methods in Enzymology 29, Nucleic Acids and Protein Synthesis Part E. 451-458. L. Grossman and K. Moldave eds. Academic Press, New York and London.
- Jehn, U., Lindahl, T., and Klein, G. (1972). Fate of virus DNA in the abortive infection of human lymphoid cell lines by Epstein-Barr virus. J. Gen. Virol. 16, 409-412.
- Kaschka-Dierich, C., Adams, A., Lindahl, T., Bornkamm, G.W., Bjursell, G., Klein, G., Giovanella, B.C., and Singh, S. (1976). Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumour cells in vivo. Nature, 260, 302-306.
- Kelly, R.B., Cozzarelli, R., Deutscher, P., Lehman, I.R., and Kornberg, A. (1970). Enzymatic synthesis of DNA. XXXII. Replication of duplex DNA by polymerase at a single strand break. J. Biol. Chem. 245, 39-45.
- Kieff, E.D., Bachenheimer, S.L., and Roizman, B. (1971). Size composition and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. J. Virol. 8, 125-132.
- Klein, G., Clifford, P., Klein, E., and Stjernswärd, J. (1966). Search for tumor specific immune reactions in Burkitt lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1628-1635.
- Klein, G., Klein, E., and Clifford, P. (1967). Search for host defenses in Burkitt lymphoma: Membrane immunofluorescence tests on biopsies and tissue culture lines. Cancer Res. 27, 2510-2520.
- Klein, G., Clifford, P., Henle, G., Henle, W., Geering, G., and Old, L.J. (1969). EBV-associated serological patterns in a Burkitt lymphoma patient during regression and recurrence. Int. J. Cancer 4, 416-421.

- Klein, G. (1974). Studies on the Epstein-Barr virus genome and the EBV-determined nuclear antigen in human malignant disease. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 783-790.
- Klein, G., Giovanella, B.C., Lindahl, T., Fialkow, P.J., Singh, S., and Stehlin J.S. (1974a). Direct evidence for the presence of Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71, 4737-4741.
- Klein, G., Lindahl, T., Jondal, M., Leibold, W., Menezes J., Nilsson, K., and Sundström, C. (1974b). Continuous lymphoid cell lines with characteristics of B cells (Bone-marrow-derived), lacking the Epstein-Barr virus genome and derived from three human lymphomas. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3283-3286.
- Laufs, R., and Fleckenstein, B. (1972). Malignant lymphoma induced by partially purified H.saimiri and recovery of infectious virus from tumorous lymph nodes. Med. Microbiol. Immunol. 158, 134-146.
- Laufs, R., and Meléndez, L.V. (1973). Oncogenicity of herpesvirus ateles in monkeys. J. Nat. Cancer Inst. 51, 599-608.
- Lavi, S., and Winocour, E. (1972). Acquisition of sequences homologous to host deoxyribonucleic acid by closed circular simian virus 40 deoxyribonucleic acid. Journal of Virology 9, 309-316.
- Lindahl, T., Klein, G., Reedman, B., Johansson, B., and Singh, S. (1974). Relationship between EBV-DNA and EBNA in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies. Int. J. Cancer 13, 764-772.

- Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, B., Bornkamm, G.W., Kaschka-Dierich, C, and Jehn, U. (1976). Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. J. Mol. Biol. 102, 511-530.
- Lang, D., and Mitani, M, (1970). Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers. Biopolymers 9, 373-379.
- Marmur, J., and Doty, P. (1962). Determination of the base composition of DNA from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5, 109-118.
- Melendez, L.V., Daniel, M.D., Hunt, R.D., and Garcia, F.G., (1968). An apparently new herpesvirus from primary kidney cultures of the squirrel monkey. Lab. Anim. Care 18, 374-381.
- Melendez, L.V., Hunt, R.D., Daniel, M.D., Garcia, F.G., and Fraser, C.E.O. (1969). H.saimiri II. Experimentally induced malignant lymphoma in primates. Lab. Anim. Care 19, 378-386.
- Melendez, L.V., Hunt, R.D., King, N.W., et al. (1972). H.ateles, a new lymphoma virus of monkeys. Nature N.B. 235, 182-184.
- Miller, G., Lisco, H., Kohn, H.L., and Stitt, D. (1971). Establishment of cell lines from normal adult blood leukocytes by exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 37, 1459-1465.
- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D., and Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 383-387.

- Miller, G., and Lipman, M. (1973). Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 190-194.
- Miller, G., Robinson, J., and Heston, L. (1974a). Immortalizing and non-immortalizing laboratory strains of EBV. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 773-781.
- Miller, G., Robinson, J., Heston, L., and Lipman M. (1974b). Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4006-4010.
- Muir, C.S. (1972). Nasopharyngeal carcinoma in non-Chinese population. In: *Oncogenesis and Herpesvirus* (P.M. Biggs, G. de Thê, and L.N. Payne, eds.), pp. 367-371, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Niederman, J.C., McCollum, R.W., Henle, G., and Henle, W. (1968). Infectious mononucleosis-clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *J. Am. Med. Assoc.* 203, 205-209.
- Niederman, J.C., Evans, A.S., Subrahmanyam, L., and McCollum, R.W. (1970). Prevalence, incidence and persistence of EB virus antibody in young adults, *New Engl. J. Med.* 282, 361-365.
- Nonoyama, M., and Pagano. J.S. (1972a). Replication of viral deoxyribonucleic acid and breakdown of cellular deoxyribonucleic acid in Epstein-Barr virus infection. *J. Virol.* 9, 714-716.
- Nonoyama, M., and Pagano. J.S. (1972b). Separation of EB virus DNA from large chromosomal DNA in non-virus-producing cells. *Nature N.B.* 238, 169-171.

- Nonoyama, M., Huang, C.H., Pagano, J.S., Klein, G., and Singh, S. (1973). DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3265-3268.
- Nonoyama, M., and Pagano, J.S. (1973). Homology between EB virus DNA and viral DNA from Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma determined by DNA-DNA reassociation kinetics. Nature, 242, 44-47.
- Old, L.J., Boyse, E.A., Oettgen, H.F., de Harven, E., Geering, G., Williamson, B., and Clifford, P. (1966). Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 1699-1704.
- Pagano, J.S. (1974a). The Epstein-Barr viral genome and its interactions with human lymphoblastoid cells and chromosomes. In: E. Kurstak and K. Maramorosch (ed.), Viruses, evolution and cancer, pp. 80-118, Academic Press, New York.
- Pagano, J.S. (1974b). The Epstein-Barr virus and malignancy: molecular evidence. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 797-805.
- Pereira, M.S. Blake, J.M., and Magrae, A.D. (1969). EB virus antibody at different ages. Brit. Med. J. 4, 526-527.
- Petterson, U., Mulder, C., Delius, H., and Sharp, P. (1973). Cleavage of adenovirus type 2 DNA into six unique fragments by endonuclease R.R1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 200-204.
- Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Howard, M., Goodman, and Boyer, H.W. (1975). Specificity of substrate recognition by the EcoR I restriction endonuclease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3310-3314.

- Pope, J.H., Horne, M.K., and Scott, W. (1969). Identification of the filtrable leukocyte-transforming factor of QIMR-WIL cells as herpes-like virus. *Int. J. Cancer* 4, 255-260.
- Pritchett, R.F., Hayward, S.D., and Kieff, E.D. (1975). DNA of Epstein-Barr virus. I. Comparative studies of the DNA of Epstein-Barr virus from HR-1 and B 95-8 cells: size, structure, and relatedness. *J. Virology* 15, 556-569.
- Rabson, A., O'Connor, G., Baron, S., Whang, J., and Legallais, F. (1966). Morphologic, cytogenetic and virologic studies in vitrol of a malignant lymphoma from an African child. *Int. J. Cancer* 1, 89-106.
- Reedman, B.M., and Klein, G. (1973). Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and nonproducer lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Cancer* 11, 499-520.
- Reedman, B.M., Klein, G., Pope, J.H., Walters, M.K., Hilgers, J., Singh, S., and Johansson B. (1974). Epstein-Barr virus-associated complement-fixing and nuclear antigens in Burkitt lymphoma biopsies. *Int. J. Cancer* 13, 755-763.
- Roberts, R.J. Arrand, J.R., and Keller, W. (1974). The length of the terminal repetition in Adenovirus-2 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3829-3833.
- Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13, 397-411.
- Sawyer, R., Evans, A., Niederman, J., and McCollum, R. (1971). Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 123, 263-270.

- Sheldrick, P., and Berthelot N. (1974). Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 39, 667-678.
- Schildkraut, C.L., and Lifson, S. (1965). Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. Biopolymers 3, 195-208.
- Schneider U., and zur Hausen H. (1975). Epstein-Barr virus-induced transformation of human leukocytes after cell fractionation. Int. J. Cancer 15, 59-66.
- Schnös, M., and Inman, R.B. (1970). Position of branch points in replicating lambda DNA. J. Mol. Biol. 51, 61-73.
- Shope T., Dechairo, D., and Miller G. (1973). Malignant lymphoma in cotton-top marmosets following inoculation of Epstein-Barr virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2487-2491.
- Schulte Holthausen, H., and zur Hausen, H. (1970). Partial purification of the Epstein-Barr virus and some properties of its DNA. Virology, 40, 776-779.
- Skare, J., Summers, W.P., and Summers, W.C. (1975). Structure and function of herpesvirus genomes. I. Comparison of five HSV-1 and two HSV-2 strains by cleavage of their DNA with EcoR I restriction endonuclease. J. Virol. 15, 726-732.
- Skare, J., and Summers, W.C. (1976). Structure and function of herpesvirus genomes. II. EcoR I, Xba I and Hind III endonuclease cleavage sites on herpes simplex virus type I DNA. J. Virology, im Druck.
- Steinhart, W.L., Grafstrom, R.H., and Hill, C.W. (1975). Terminal fragments of herpes simplex virus DNA produced by restriction endonuclease. Biochem. Biophys. Res. Comm. 67, 556-561.

- Sugden, B., Summers, W.C., and Klein G. (1976). Nucleic acid renaturation and restriction endonuclease cleavage analyses show that the DNAs of a transforming and a nontransforming strain of Epstein-Barr virus share approximately 90% of their nucleotide sequences. *Journal of Virology* 18, 765-775.
- Svedmyr, A., and Demissie, A. (1968). Age distribution of antibodies to Burkitt cells. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 73, 653-654.
- Tai, H.T., Smith, C.A., Sharp, P.A., and Vinograd J. (1972). Sequence heterogeneity in closed simian virus 40 deoxyribonucleic acid. *Journal of Virology*, 9, 317-325.
- Tanaka A., and Nonoyama, M. (1974). Latent DNA of Epstein-Barr virus: Separation from high-molecular-weight cell DNA in a neutral glycerol gradient. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4658-4661.
- Ullmann, J.S., and McCarthy, B.J. (1973). The relationship between mismatched base pairs and the thermal stability of DNA duplexes. II. Effects of deamination of cytosine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 294, 416-424.
- Wadsworth, S.C., Jacob, R.J., and Roizman, B. (1975). Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J. Virol.* 15, 1487-1497.
- Wagner, M., Skare, J., and Summers, W.C. (1974). Analysis of DNA of defective herpes simplex virus type 1 by restriction endonuclease cleavage and nucleic acid hybridization. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 683-686.
- Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature N.B.* 239, 197-200.
- Werner, F.J., Bornkamm, G.W., and Fleckenstein, B. (1976). Episomal viral DNA in a H. saimiri-transformed lymphoid cell line. *J. Virol.* (1976), zum Druck eingereicht.

- Wetmur, J., and Davidson, N. (1968). Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 31, 349-370.
- Wolf, H., zur Hausen, H., and Becker, V. (1973). EB-viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biol.*, 244, 245-247.
- Wolf, H., Werner, J., and zur Hausen, H. (1975). EBV-DNA in non-lymphoid cells of nasopharyngeal carcinomas and in malignant lymphoma obtained after inoculation of EBV into cottontop marmosets. 39th Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., 791-796.
- Wolfe, L.G., Falk, A.L., and Deinhardt, F. (1971). Oncogenicity of herpesvirus saimiri in marmoset monkeys. *J. Nat. Cancer Inst.* 47, 1145-1162.
- Wolfe, L.G., and Deinhardt, F. (1972). H.saimiri: Incidence of latent infection in squirrel monkeys. *Fed. Proc.* 31, 806.
- Yajima, Y., and Nonoyama, M. (1976). Mechanisms of infection with Epstein-Barr virus. I. Viral DNA replication and formation of noninfectious virus particles in superinfected Raji cells. *Journal of Virology*, 19, 187-194.
- zur Hausen, H., and Schulte-Holthausen, H. (1970). Presence of EB virus nucleic acid homology in a "virus free" line of Burkitt tumour cells. *Nature* 227, 245-248.
- zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. (1970). EBV-DNA in biopsies of Burkitt tumour and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228, 1056-1058.
- zur Hausen, H. (1975). Oncogenic herepsviruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 417, 25-53.

VERÖFFENTLICHUNGEN ZUM THEMA DER ARBEIT

Fleckenstein, B., and Bornkamm, G.W.

Structure and function of herpesvirus saimiri DNA. In: Oncogenesis and herpesviruses II, 145-149, G. de Thé, H. zur Hausen, A.M.Epstein, eds. IARC Press, Lyon (1975)

Fleckenstein, B. und Bornkamm, G.W. ✓

Die Struktur der Herpesvirus saimiri Genome.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 230 (1975)

Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., and Ludwig, H.

Repetitive sequences in complete and defective genomes of herpesvirus saimiri.

J. Virol. 15, 398-406 (1975)

Fleckenstein, B., Werner, J., Bornkamm, G.W., zur Hausen, H.

Induction of a malignant lymphoma by herpes virus saimiri DNA.

Int. Workshop on Production, Concentration and Purification of Epstein-Barr Virus and Antigens, Washington, Febr. 10-12, 1975, IARC Lyon, 159-164

Bornkamm, G.W., Delius, H., Fleckenstein, B., Werner, F.-J., and Mulder, C.

The structure of H. saimiri genomes. Arrangement of heavy and light sequences within the M-genome.

J. Virol., 19, 154-161 (1976)

Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., and Werner, F.-J.

The role of herpesvirus saimiri genomes in oncogenic transformation of primate cells.

In Comparative Leukemia Research

J. Clemmesen and D. Yohn eds.

S. Karger, Basel, Bibl. Haematol. 43, 308-312 (1976)

Werner, F.-J., Bornkamm, G.W., and Fleckenstein, B.

Episomal viral DNA in a herpesvirus saimiri-transformed lymphoid cell line.

J. Virol. 22, 794-803 (1977)

Werner, F.-J., Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., and Mulder, C.
Episomal viral DNA in herpesvirus saimiri transformed lymphoid cell lines.

In Oncogenesis and Herpesviruses III. 1977.

IARC, Press Lyon (im Druck)

Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., Mulder, C., Werner, F.-J.,
Daniel, M.D., Falk, L.A., and Delius, H.

Herpesvirus ateles DNA and its homology with herpesvirus saimiri nucleic acid.

J. Virol. 78, 361-373

Werner, F.-J., Desrosiers, R.C., Mulder, C., Bornkamm, G.W.,
and Fleckenstein, B.

Physical mapping of viral episomes in herpesvirus saimiri
transformed lymphoid cells.

In Persistent Virus Infections

J. Stevens, G. Todaro eds.

UCLA Symposium, Keystone, Colorado 1978 (im Druck)

zur Hausen, H., Bornkamm, G.W., and Wolf, H.

Purification of Epstein-Barr Virus and use of its DNA in
nucleic acid hybridizations.

Int. Workshop on Production, Concentration and Purification
of Epstein-Barr Virus and Antigens, Washington, Febr. 10-12,
1975, IARC Lyon, 107-128

Bornkamm, G.W., Stein, H., Lennert, K., Rüggeberg, F.,
Bartels, H., and zur Hausen, H.

Attempts to demonstrate virus-specific sequences in human
tumors. IV. EB viral DNA in European Burkitt lymphoma and
immunoblastic lymphadenopathy with excesssive plasmacytosis.
Int. J. Cancer, 17, 177-181 (1976)

Kaschka-Dierich, C., Adams, A., Lindahl, T., Bornkamm, G.W.,
Bjursell, G., Klein, G., Giovanella, B.C., and Singh, S.
Intracellular forms of Epstein-Barr Virus DNA in human tumour
cells in vivo.

Nature, Vol. 260, 302-306 (1976)

Lindahl, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G.W., Kaschka-Dierich, C., and Jehn, U.

Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr Virus in a human lymphoid cell line.

J. Mol. Biol. 102, 511-530 (1976)

Fresen, K.O., Merkt, B., Bornkamm, G.W., and zur Hausen, H.
Heterogeneity of Epstein-Barr virus originating from P3HR1 cells. I. Studies on EBNA induction.

Int. J. Cancer, 19, 317-323 (1977)

Miller, G., Shope, T., Coope, D., Waters, L., Pagano, J., Bornkamm, G.W., and Henle, W.

Lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus: Tumor incidence, histologic spectrum antibody responses, demonstration of viral DNA, and characterization of viruses.

The J. of Exp. Med., Vol. 145 (1977)

Schneider, U., Schwenk, H.-U., and Bornkamm, G.W.

Characterization of EBV-genome negative "Null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.

Int. J. Cancer, 19, 621-626

Rosenfeld, C., Goutner, A., Kayibanda, B., Venuat, A.M.,
Choquet, C., Pico, J., Petitou, M., Lorans, G., Tuy, F., Des-
grange, C., Bornkamm, G.W., Dore, J.F., and de Thé, G.
Establishment and characterization of a truly leukaemic
cell line.

In Haematology and Blood Transfusion
S. Thierfelder, H. Rodt, E. Thiel eds.
Vol. 20, 271-276 (1977)

zur Hausen, H., Fresen, K.-O., Bornkamm, G.W.
Epstein-Barr Virus genomes and their biological functions:
A review.
In Oncogenesis and Herpesviruses III. 1977.
IARC Press, Lyon (im Druck)

Kayibanda, B., Rosenfeld, C., Goutner, A., and Bornkamm, G.W.
A new lymphoid cell line, Reh 6, with characteristics of non-T
and non-B cells, lacking the Epstein-Barr virus genome and de-
rived from human acute lymphoblastic leukemia.
Intervirology, 9, 316-320 (1978)

de Thé, G., Geser, A., Day, N.E., Tukei, P.M., Munube, G.,
Williams, E.H., Beri, D.P., Smith, P.G., Dean, A., Bornkamm, G.W.,
Feorino, P., and Henle, W.
Epidemiological evidence implicating the Epstein-Barr virus in
the causation of Burkitt's lymphoma in Uganda.
1978 (im Druck)

Delius, H., and Bornkamm, G.W.

Heterogeneity of Epstein-Barr virus. III. Comparison of a transforming and a non-transforming virus by partial denaturation mapping of their DNA.

J. Virol., 1978 (im Druck)

Herrn Prof. Dr. H. zur Hausen gilt mein besonderer Dank für die zahlreichen Anregungen und die permanente Förderung der Arbeit.

Meinen Kollegen Dr. B. Fleckenstein, Dr. H. Delius und Dr. C. Mulder möchte ich herzlich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit danken.

Frl. U. Bergholz und Frl. G. Rosenberger, die in vorbildlicher Weise bei der Durchführung der Experimente halfen, sollen dankbar erwähnt werden.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 118 gefördert.

